

**UNTERSUCHUNG ÜBER DIE EIGNUNG
EINES INDIREKTEN HÄMAGGLUTINATIONSTESTS
ZUR IDENTIFIZIERUNG VON EUTERPATHOGENEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS-STÄMMEN VOM RIND**

DAGMAR SCHWEIGHART-BANZHAF

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Universität München

Lehrstuhl: Prof. Dr. M. Rüsse

Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. K. Walser

Untersuchung über die Eignung eines
indirekten Hämagglutinationstests zur Identifizierung
von euterpathogenen *Staphylococcus aureus*-Stämmen vom Rind

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Dagmar Schweighart-Banzhaf
aus München

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. K. Walser

Korreferent: Prof. Dr. M.-A. Hasslinger

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
2. Literatur	3
2.1. Zur Systematik der Micrococcaceae	3
2.2. Biologische Eigenschaften der Staphylokokken	6
2.2.1. Plasmakoagulase	6
2.2.2. Clumping factor	21
2.2.3. Hämolyse	32
2.2.4. Pigmentbildung	39
2.3. Lysostaphin-Test	43
2.4. Furazolidon-Pepton-Agar	48
3. Eigene Untersuchungen	50
3.1 Material	50
3.2 Methoden	50
3.2.1. Differenzierung zwischen Micrococcaceae und Streptococcaceae mit Hilfe des Katalase-Testes	51
3.2.2. Vordifferenzierung von Stämmen der Familie Micrococcaceae	52
3.2.2.1. Lysostaphin-Test	52
3.2.2.2. Furazolidon-Pepton-Agar	53
3.2.3. Speziesdifferenzierung der Gattung Staphylococcus	54
3.2.3.1. Plasmakoagulase	54

3.2.3.2. Clumping factor	55
3.2.3.2.1. Clumping factor-Objektträgertest	55
3.2.3.2.2. Staphyslide Test	55
3.2.3.3. Hämolyse	56
3.2.3.4. Pigmentbildung	57
3.3. Untersuchungsergebnisse	58
3.3.1. Identifizierung der Micrococcaceae mit dem Katalase- Test	58
3.3.2. Vordifferenzierung von Stämmen der Familie Micro- coccaceae	58
3.3.2.1. Lysostaphin-Test	58
3.3.2.2. Furazolidon-Pepton-Agar	59
3.3.3. Speziesdifferenzierung der Gattung Staphylococcus	60
3.3.3.1. Plasmakoagulase	60
3.3.3.2. Clumping factor	61
3.3.3.2.1. Clumping factor-Objektträgertest	61
3.3.3.2.2. Staphyslide Test	61
3.3.3.3. Hämolyse	63
3.3.3.4. Pigmentbildung	64
4. Diskussion	65
5. Zusammenfassung/Summary	85
6. Literaturverzeichnis	89

1. Einleitung

Bei den Staphylokokken handelt es sich um eine weitverbreitete Bakteriengattung. Besondere Bedeutung haben sie als Erreger von Eiterungen und Mastitiden sowie als Lebensmittelvergifter.

Die einzelnen Stämme weisen unterschiedliche Virulenzgrade auf. Es sind zahlreiche Untersuchungsverfahren ausgearbeitet worden, um pathogene Staphylokokken identifizieren zu können. Zu den wichtigsten Virulenzfaktoren von Staph. aureus gehören Plasmakoagulase, Clumping factor, Protein A, Thernonuklease, Hämolsine, Leukozidin, Lipasen, Hyaluronidase, Staphylokinase, Penicillinase und Enterotoxine (BLOBEL und Mitarb., 1977; ROLLE und MAYR, 1984).

Die Zunahme der Euterbesiedelungen und Mastitiden durch Staphylokokken fällt zeitlich mit der vermehrten Anwendung von Antibiotika in der tierärztlichen Praxis und der Verbreitung der Melkanlagen zusammen (TERPLAN und ZAADHOF, 1969).

Nach HEESCHEN und Mitarb. (1970) sind über die Hälfte der nachgewiesenen Mastitiserreger aus Viertelgemelksproben Staphylokokken. Sie lassen anhand der Zellzahlbefunde eine deutliche Euterpathogenität erkennen. Außerdem sind Angehörige der Gattung Staphylococcus in der Lage, akute Mastitiden mit Störung des Allgemeinbefindens zu verursachen.

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, einen indirekten Hämagglutinationstest (Staphyslide der Fa. bioMerieux) auf seine Brauchbarkeit in der Routinediagnostik zur Identifizierung von Staph. aureus aus Milchproben zu untersuchen.

2. Literatur

2.1. Zur Systematik der Micrococcaceae

BAIRD PARKER (1963,1965) hat grampositive und katalasepositive Kokken der Familie Micrococcaceae aus unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien in drei Genera unterteilt:

A: Staphylococcus mit sechs Untergruppen

B: Micrococcus mit acht Untergruppen

C: Sarcinia

Später teilte BAIRD PARKER (1974) in BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (1974) die Familie Micrococcaceae PRIBRAM 1929, Ordnung Eubacteriales, in folgende drei Genera ein:

A: Staphylococcus, bestehend aus den Spezies Staph. aureus, Staph. epidermidis und Staph. saprophyticus

B: Micrococcus

C: Planococcus

Staphylococcus aureus ROSENBACH 1884, zu dem ausschließlich solche Kokken gehören, die im allgemeinen in unregelmäßigen Haufen, gelegentlich einzeln, in Diplo- oder Tetradenform vorliegen, vermag Glukose anaerob unter Säurebildung zu spalten und ist fakultativer Anaerobier.

Eine positive Koagulasereaktion und DNaseproduktion werden als Hauptmerkmale von Staph. aureus beschrieben.

HAJEK und MARSALEK (1971) und MARSALEK und HAJEK (1973) differenzierten koagulasepositive Stämme von humaner und tierischer Herkunft in sechs Biotypen (A bis F). Sie identifizierten *Staph. aureus* durch eine positive Koagulase-reaktion und den Thermanukleasetest, anstatt der Mannitolfermentation, wie es das SUBCOMMITTEE ON TAXONOMY OF STAPHYLOCOCCI AND MICROCOCCI (1965) empfahl, um pathogene Staphylokokken von nicht pathogenen zu unterscheiden.

SCHLEIFER und KOCUR (1973) und SCHLEIFER und Mitarb. (1976) bezogen sich auf die sechs Biotypen von HAJEK und MARSALEK (1971). Sie unterteilten ihr humanes und tierisches Untersuchungsmaterial in eine koagulasepositive Gruppe und neun koagulasenegative Gruppen. Sie wiesen auf andere koagulasepositive Staphylokokkenspezies neben *Staph. aureus* hin, die sie von Hund, Pferd und Geflügel isolierten.

KLOOS und SCHLEIFER (1975) haben 13 biochemische Eigenschaften herausgearbeitet, um humane Staphylokokkenstämme in der Routinediagnostik identifizieren zu können. Sie haben über 900 Isolate in ein Schema mit 11 Spezies eingeteilt.

HAJEK (1976) definierte eine neue koagulasepositive Spezies, die er von verschiedenen Tieren isolieren konnte, und benannte sie *Staph. intermedius*.

HAJEK und MARSALEK (1976) empfahlen eine Überholung des Klassifizierungsschemas nach BAIRD PARKER (1974) für koagulasepositive Staphylokokken. Sie teilten das Genus *Staphylococcus* mit verschiedenen biochemischen und physikalischen

Tests in die Spezies *Staph. aureus*, *Staph. intermedius* und *Staph. epidermidis* ein.

DEVRIESE und Mitarb. (1985) untersuchten 661 Staphylokokkenstämme von Rind, Schwein, Geflügel und kleinen Wiederkäuern. Sie konnten keinen einzigen *Staph. intermedius*-Stamm isolieren.

BORNSTEIN und FLEURETTE (1981) isolierten *Staph. intermedius* nur von Hund und Geflügel.

Ebenso konnten PHILIPPS und KLOOS (1981) *Staph. intermedius* nur beim Hund identifizieren. Eine weitere koagulasepositive Spezies, *Staph. hyicus* subsp. *hyicus*, erhielten sie aus Probenmaterial vom Schwein und aus Rindermilchproben.

KLOOS und SCHLEIFER (1981) teilten Staphylokokken aus Viertelgemarkungsproben vom Rind folgendermaßen ein:

A: Koagulasepositive Spezies: Vor allem *Staph. aureus* sowie *Staph. hyicus* und *Staph. intermedius*.

Staph. intermedius kann aufgrund einer negativen Clumping factor Reaktion (außer bei caninen Stämmen, die normalerweise Clumping factor-positiv sind) ebenso wie *Staph. hyicus* von dem Clumping factor-positiven *Staph. aureus* unterschieden werden.

B: Koagulasenegativen Spezies wurde bisher noch nicht viel Bedeutung zugemessen. Sie können u.a. mit Hilfe ihrer Novobiocin- und Lysostaphinresistenz von den koagulasepositiven Staphylokokken differenziert werden.



DEVRIESE (1984) unterteilte *Staph. aureus* von Mensch und Tier in wirtsspezifische Ecovars (Biotypen, die sich nur auf eine einzige Wirtstierart beziehen) und Biotypen, die nicht wirtsspezifisch sind. Dabei ergab sich, daß diese Einteilung weitgehend der von HAJEK und MARSALEK (1971) entsprach. 604 von 809 Staphylokokkenstämmen von Mensch, Geflügel, Rind, Schwein, Ziege, Kaninchen und Lebensmitteln konnten in vier Ecovars und fünf nicht wirtsspezifische Biotypen unterteilt werden.

2.2. Biologische Eigenschaften der Staphylokokken

2.2.1. Plasmakoagulase

Als bevorzugtes Verfahren zum Nachweis der Plasmakoagulase stellte sich im Laufe der Zeit immer wieder der Röhrchentest heraus.

Die beschriebenen Möglichkeiten der Durchführung des Röhrchentests unterscheiden sich vor allem in der Reaktionsdauer, der Reaktionstemperatur, der Art des verwendeten Plasmas und der Interpretation der Ergebnisse mit Einteilung der Klumpenbildung in vier Grade.

LOEB (1903) und MUCH (1908) hatten entdeckt, daß goldgelbes Pigment bildende Staphylokokken Plasma zum Gerinnen bringen können.

MUCH (1908) erkannte eine Thrombokinase als Ursache für die Gerinnungsreaktion und nannte diese Thrombokinase "Staphylokinase".

CHAPMAN u. Mitarb. (1937) hatten die Koagulasereaktion mit Staphylokokken aus humanmedizinischem Untersuchungsmaterial und aus bovinen Mastitisproben durchgeführt. Für die Autoren galt jeder koagulaserepositive Stamm als pathogen. Hämolyseverhalten und Pigmentbildungsvermögen wurden herangezogen, um eine Aussage über den Grad der Pathogenität machen zu können. CHAPMAN u. Mitarb. (1941) machten noch genauere Angaben über den Röhrchenkoagulasetest und empfahlen ein 1:4 verdünntes Plasma von Mensch oder Kaninchen mit möglichst wenig Antikoagulans zu verwenden, um ein festes Koagulum zu erhalten.

Es wurde bis zu vier Stunden lang bei einer Inkubationstemperatur von 37°C stündlich die entstehende Reaktion abgelesen, danach die Röhrchen bei Raumtemperatur stehengelassen und nach 24 Stunden wieder abgelesen.

FIELD und SMITH (1945) führten ebenfalls zum Nachweis der Pathogenität von Staphylokokken den Koagulasetest durch. Untersucht wurden Isolate von Lebensmitteln, Mensch und Tier. Zur Durchführung des Tests verwendeten sie Plasma von Mensch, Rind, Maus, Kaninchen und Katze sowie reines Fibrinogen. Die Autoren schrieben die Reaktionen sowohl im Röhrchentest als auch auf dem Objektträger der Koagulase, die sich auf der

Oberfläche pathogener Staphylokokken befindet und Fibrinogen koaguliert, zu. Sie gaben auf Grund der einfacheren Durchführung dem Objektträgertest den Vorzug.

DUTHIE (1954,1955) unterschied deutlich die gebundene Koagulase, die er auch "clumping factor" nannte, von der freien Koagulase.

Die gebundene Koagulase (clumping factor) ist an der Zelloberfläche lokalisiert und wird im Objektträgertest (slide test) nachgewiesen. Sie wirkt direkt auf das Fibrinogen verschiedener Tierspezies und führt zu einer Verklumpung der Staphylokokkenzellen.

Die freie Koagulase jedoch wird in das Medium abgegeben und bildet zusammen mit Prothrombin von verschiedenen Tierarten ein dem Thrombin ähnliches Produkt. Im Röhrchentest kommt es zu einer Koagulumbildung. DUTHIE vermutete, daß die freie Koagulase enzymatische Eigenschaften besitze.

LOMINSKI (1953) führte die unterschiedliche Intensität der Koagulaseproduktion in vitro von verschiedenen Staph. aureus-Stämmen auf einen die Koagulase zerstörenden Faktor zurück. Dieses proteolytische Enzym wird von einigen Staph.aureus-Varianten produziert, die er als "smooth variants" bezeichnete. MUNCH-PETERSEN (1960) und MUNCH-PETERSEN und GARDINER (1965) wiesen darauf hin, daß in der Literatur keine Einigkeit darüber besteht, ob die Pathogenität von Staphylokokken mit der Produktion von Koagulase einhergeht.

Die meisten koagulasepositiven Staphylokokken erwiesen sich zwar als pathogen, doch waren nicht alle koagulasenegativen Stämme apathogen.

Bovine Mastitisstämme wurden im Röhrchenkoagulasetest mit Kaninchenplasma untersucht. Stark hämolysierende Stämme reagierten koagulasepositiv. Schwach hämolysierende Stämme nahmen eine Zwischenstellung ein und nicht hämolysierende Stämme waren koagulasenegativ.

FAHLBERG und MARSTON (1959) beschrieben die Koagulaseproduktion als typische Eigenschaft von Staph.aureus, die am besten nach höchstens sechs Stunden Inkubation bei 37 °C im Wasserbad zu beobachten war.

REID und WILSON (1959) sowie SCHALM und WOODS (1959) hielten den Koagulasetest neben der Hämolysen für geeignet, die Pathogenität der Stämme aus Milchproben mastitiskranker Rinder zu beurteilen.

BLOBEL und Mitarb. (1960) isolierten die Staphylokoagulase von humanen und bovinen Stämmen. Sie injizierten dieses Enzym Kaninchen und stellten fest, daß es zu der Bildung von Koagulase hemmenden Antikörpern kam.

MOSSEL (1962) bestätigte die Systematik von EVANS (1957) in der siebenten Ausgabe des BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY und identifizierte Staph. aureus mit dem Koagulasetest und der anaeroben Dissimilation von Mannitol.

COWAN und STEEL (1964) schlugen vor, die Staphylokokken in

zwei Spezies zu unterteilen: *Staph. aureus* (koagulasepositiv) und *Staph. epidermidis* (koagulasenegativ).

MESSER (1961) untersuchte 384 Rindermilchproben. 93,9% der koagulasepositiven Stämme zeigten eine Hämolysebildung auf der Blutagarplatte. Als zuverlässigstes Merkmal für die Pathogenität von Staphylokokken sah er die Plasmakoagulase an.

FINK (1961) untersuchte u.a. 72 Staphylokokkenstämme aus Rinder- und Ziegenmilchproben. Er verwendete Kaninchen- und Schweineplasma und erhielt eine 95%ige Übereinstimmung zwischen Plasmaagglutination und Plasmakoagulation im Röhrchen-test. Der Autor empfiehlt den Objektträger- und den Röhrchen-test für die Routinediagnostik zur Pathogenitätsbestimmung.

Das SUBCOMMITTEE ON TAXONOMY OF STAPHYLOCOCCI AND MICROCOCCI (1965) gab eine Standardmethode zur Durchführung des Röhrchenkoagulasetests zur Identifizierung von Staphylokokken an: Grampositive und katalasepositive Kokken wurden auf Säureproduktion aus Glukose und auf Bildung freier Koagulase untersucht. Dabei wurde 1:5 verdünntes Zitratplasma vom Kaninchen verwendet, das mit einer 24 Stunden lang auf Blutagar bebrüteten Kultur des zu testenden Stammes vermischt und bei 37°C im Wasserbad inkubiert wurde. Nach 1,2,4,8 und nach 24 Stunden wurde auf Plasmaverklumpung untersucht. Jede Verklumpung wurde als positives Ergebnis gewertet.

ABO ELNAGA und KANDLER (1965a) führten den Röhrchenkoagulase-

test nach CHAPMAN und Mitarb. (1941) durch. 165 Staphylokokkenstämme wurden aus bovinen Milchproben isoliert. 97 erwiesen sich als koagulasepositiv und 68 als koagulase-negativ.

Die Arbeit unterstreicht den Wert der Koagulaseprobe und zeigt, daß sie für die Routinediagnostik ausreichend ist, um die Pathogenität von Staphylokokken zu bestimmen.

ABO ELNAGA und KANDLER (1965 b) haben Anlieferungsmilch im süddeutschen Raum auf koagulasepositive Staphylokokken untersucht. Sie konnten in über 50% der untersuchten Proben koagulasepositive Staphylokokken nachweisen.

DUTHIE und LORENZ (1952) haben Plasma von verschiedenen Tierarten getestet. Die Proben enthielten unterschiedliche Mengen an Koagulaseaktivator. Dieser Aktivator ähnelt in seinen physikalischen Eigenschaften dem Prothrombin. Am geeignetsten erschien den Autoren Kaninchenplasma zusammen mit humanem Fibrinogen für den Koagulasetest. Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C erhielten sie bereits nach 30 Minuten eine Flockenbildung.

ORTH und Mitarb. (1971) bezeichneten den Aktivator von DUTHIE und LORENZ (1952) als "Coagulase Reacting Factor" (CRF).

Sie stellten folgendes Konzentrationsgefälle des CRF in den verschiedenen Sera fest:

Mensch > Schwein > Kaninchen > Pferd > Rind > Huhn und Lamm.

Zur praktischen Anwendung empfahlen sie heparinisiertes Schweineplasma für den Koagulasetest.

SEIFFGE (1976) untersuchte 264 Staphylokokkenkulturen. Für den Koagulasetest im Röhrchenverfahren eignete sich am besten 1:5 verdünntes Zitratplasma vom Schwein. Damit konnte er Staph. aureus verschiedener Herkunft identifizieren.

YRIOS (1977) stellte bei 627 humanen Isolaten fest, daß heparinisiertes Schweineplasma im Koagulasetest fast identische Ergebnisse wie im Handel erhältliches Kaninchenplasma erbrachte. Er identifizierte Staph. aureus durch eine positive Koagulasereaktion und die thermostabile Nuklease.

ESSERS und RADEBOLD (1980a) erhielten folgende Ergebnisse im Röhrchenkoagulasetest für 218 Staph.aureus-Stämme aus menschlichem Untersuchungsmaterial:

Humanplasma (Blutbank),

abgelesen nach 6 Std: 97,8% korrekt identifiziert

Kaninchenplasma,

abgelesen nach 6 Std: 98.9% " "

Humanplasma (Blutbank) nach FISK

(1940), abgelesen nach 2 Std. : 99.7% " "

Human- und Schweineplasma nach

FISK (1940), abgelesen nach 2 Std: 100 % " "

Die Optimierung nach FISK (1940) besteht in einer Vorinkubation der Kulturen in Peptonbouillon und in einer Plasmaverdünnung von 1:10.

FINKELSTEIN und SULKIN (1958) beschrieben eine neue Methode zur Differenzierung koagulasepositiver von koagulase negativen

Staphylokokken in Serum-Weich-Agar nach FINKELSTEIN und SULKIN (1958). Kaninchen- und humanes Plasma enthalten einen Faktor, der den Kolonien von koagulasepositiven Staphylokokken im Serum-Weich-Agar ein typisches Aussehen verleiht.

ALAMI und KELLY (1959) benutzten die Weich-Agar-Methode, um gleichzeitig den "Clumping factor" und die freie Koagulase zu bestimmen. Sie untersuchten das Erscheinungsbild der Kolonien im Albumin-Plasma-Fibrinogen-Weich Agar.

RAYMOND und TRAUB (1970) benutzten einen Koagulase-Mannitol-Agar, um die freie Koagulase zusammen mit der Mannitol-Fermentation zu bestimmen. Sie konnten 204 Staph. aureus-Stämme von 350 Staphylokokkenstämmen aus humanem Untersuchungsmaterial damit identifizieren.

HEESCHEN und Mitarb. (1970) hielten die Koagulaseprobe bei Verwendung von Kaninchen- oder Rinderplasma zur Selektion von Staphylokokken boviner Herkunft für ungeeignet und gaben der Objektträger-Plasma-Agglutination (Clumping factor Reaktion) den Vorzug. Sie erfaßten damit 99% der koagulasepositiven Staphylokokken.

Ebenso sprachen sich MORTON und COHN (1972) gegen den Koagulasetest als einziges Kriterium zur Pathogenitätsbeurteilung aus.

BARRY und Mitarb. (1973) dagegen empfahlen die Durchführung des Röhrchenkoagulase- und Objektträgertests, um Staph. aureus als pathogenen Keim zu identifizieren.

DEVRIESE und Mitarb. (1972) isolierten 776 Staph. aureus-Stämme von boviner Mastitis. Sie verwendeten den Objektträgerstest zum Nachweis des Clumping factor und bei negativem Ergebnis zusätzlich den Röhrchenkoagulasetest.

DEVRIESE und OEDING (1976) untersuchten weitere 544 Stämme von Mensch und verschiedenen Tierspezies. Die Identifizierung von Staph. aureus mit Hilfe des Objektträger-, Röhrchenkoagulase- und DNasetests war unschwer durchzuführen. Humane und bovine Staph. aureus-Stämme zeigten in allen drei Tests immer positive Ergebnisse. Der Objektträgerstest mit Kaninchenplasma wurde wegen der einfachen Durchführbarkeit empfohlen, um bovine, humane und aviäre Staph. aureus-Stämme zu identifizieren.

ZAJDEL und Mitarb. (1973, 1976) beschrieben die genaue Wirkungsweise der Staphylokoagulase. Die Staphylokoagulase ist ein extrazelluläres Protein von pathogenen Staphylokokken. Sie bildet mit Prothrombin einen stabilen Komplex, genannt Staphylothrombin, der enzymatische Eigenschaften besitzt. Das Prothrombin wird von den Autoren auch "Coagulase Reacting Factor" oder Plasmakofaktor genannt. Staphylothrombin veranlaßt den enzymatischen Umbau des löslichen Plasmaproteins Fibrinogen in das unlösliche Fibrin.

Dieser Vorgang wird im Röhrchenkoagulasetest durch Klumpenbildung sichtbar.

RAYMAN und Mitarb. (1975) prüften 194 Stämme aus verschie-

denen Untersuchungsmaterialien auf ihre Fähigkeit, Koagulase zu produzieren. Sie verwendeten EDTA-Kaninchenplasma im Röhrchenkoagulasetest. Die Plasmaverklumpung teilten sie in vier Grade ein. Eine 4+ Reaktion entsprach einer vollständigen Plasmakoagulation. Das Koagulum blieb an der Röhrchenwand kleben, wenn man das Reagenzglas kippte. Die 3+ und 2+ Reaktionen zeigten einen mehr oder weniger festen kleineren Klumpen, der frei beweglich und von klarem Plasma umgeben war. Eine 1+ Reaktion entsprach sehr kleiner, unorganisierter Klumpenbildung. Für die Autoren galt nur eine 4+ und 3+ Reaktion als positives Testergebnis. Bei einer 2+ Reaktion führten sie zusätzlich den Thernonukleasetest und / oder die anaerobe Fermentation von Glukose und Mannitol durch, um Staph. aureus zu identifizieren.

SPERBER und TATINI (1975) testeten Stämme von Lebensmitteln im Röhrchenkoagulasetest mit EDTA-Kaninchenplasma. Sie empfahlen die Ablesung in Intervallen von 2,4 und 24 Stunden, wegen einer eventuell entstehenden Proteaseaktivität, die das entstandene Koagulum wieder auflösen könnte. Sie ließen nur eine 4+ Reaktion als positives Testergebnis gelten.

BLOBEL und Mitarb. (1977) und BLOBEL (1977) identifizierten Staph. aureus aus Milchproben mastitiserkrankter Rinder durch die Hämolyse bei der Anzüchtung und den Nachweis der Plasmakoagulase bzw. des Clumping factors.

ZARZOUR und BELLE (1978) führten den Plasmakoagulasetest mit

EDTA-Kaninchenplasma durch und lasen nach 2,4 und 24 Stunden ab. Bei 98% der 450 *Staph. aureus*-Stämme aus humanmedizinischem Untersuchungsmaterial war die Koagulasereaktion nach vier Stunden abgeschlossen. Als positives Ergebnis galt eine 3+ oder 4+ Reaktion. Bei 1+ oder 2+ Ergebnissen führten die Autoren zusätzlich den hitzestabilen Nukleasetest durch. BROWN und SCHERER (1978) untersuchten Milchproben vom Rind und identifizierten *Staph. aureus* anhand einer positiven Koagulasereaktion sowie einer $\alpha, \alpha\beta$ oder β -Hämolysen.

DEVRIESE (1977,1979), DEVRIESE und Mitarb. (1978), DEVRIESE und DERYCKE (1979) und DEVRIESE und HAJEK (1980) isolierten eine neue koagulasepositive Spezies vom Schwein und nannten sie *Staph. hyicus*. *Staph. hyicus* subsp. *hyicus* kann eine positive Röhrchenkoagulasereaktion zeigen, hat aber keinen Clumping factor, ist β -Hämolysin-negativ sowie pigmentlos. Nachdem man auch andere koagulasepositive Staphylokokken vom Rind isoliert hat, empfahlen die Autoren zur Identifizierung von *Staph. aureus*, die β -Hämolysinproduktion, den Clumping factor Test und die DNase-Reaktion heranzuziehen. Zur Routinediagnostik hielten sie einen dieser Tests für ausreichend, wenn ein pigmentierter Stamm vorlag.

AMTSBERG (1978,1979) isolierte *Staph. hyicus* vom Schwein und stellte fest, daß *Staph. epidermidis* Biotyp 2 von Hautproben vom Rind ein identisches kulturelles, biochemisches und serologisches Verhalten zeigte wie *Staph. hyicus* vom Schwein.

WEGRZYNOWICZ und Mitarb. (1979, 1980) entdeckten, daß *Staph. aureus* neben der Koagulase auch eine Metalloprotease produzieren kann. Beide Enzyme aktivieren Prothrombin und erzielen dadurch den Verklumpungseffekt. Die Autoren empfahlen deshalb den Zusatz von Koagulaseinhibitoren z.B. EDTA im Koagulasetest, um die echte Staphylokoagulaseaktivität bestimmen zu können.

Diese sogenannte "Pseudokoagulase" wurde auch von BULANDA und Mitarb. (1981) bei 50% der humanen Staphylokokken zusammen mit der echten Koagulase nachgewiesen.

KITZROW und BLOBEL (1981) testeten die Koagulaseaktivität an insgesamt 331 *Staph. aureus* Kulturen von Mensch, Rind, Schwein und Hund. Sie verwendeten 1:5 verdünntes Kaninchenplasma. Ein eben sichtbares Koagulum galt als positive Reaktion. Der Nachweis der Koagulase von *Staph. aureus* wurde teilweise von der Staphylokinase sowie auch von einer Staphylokokkenprotease beeinträchtigt.

Staphylokinase bewirkte eine Auflösung des koagulase-induzierten Plasmakoagulums durch Umwandlung von Plasminogen in Plasmin. Diese Staphylokinaseaktivität konnte durch Zusatz eines Proteaseinhibitors (Trasylol) gehemmt werden.

Die Protease bewirkte eine Verminderung der Koagulaseaktivität und der Reaktionsfähigkeit des Koagulasenachweis-Systems. Die Proteaseaktivität konnte durch Serum-Albumin und Casein reduziert werden.

HECZKO und Mitarb. (1981) empfahlen, nachdem man auch beim Rind eine weitere koagulasepositive Staphylokokkenspezies (*Staph. hyicus* subsp. *hyicus*) sowie die Aktivität der Pseudokoagulase entdeckt hatte, die Speziesdifferenzierung der Staphylokokken nicht allein mit dem Plasmakoagulase-Test durchzuführen.

KITZROW und Mitarb. (1981) konnten durch verbesserte Züchtungsbedingungen von *Staph. aureus* im Fermenter eine effektivere Produktion der Koagulase erzielen. Die gereinigte Koagulase der *Staph. aureus*-Kulturen von Mensch, Rind und Hund hatte ein Molekulargewicht zwischen 56800 und 71000.

ENGELS und Mitarb. (1981) entwickelten ein Testsystem, das Staphylokoagulase von *Staph. aureus* mit Hilfe von ChromozymTH mißt. Der herkömmliche Koagulasetest wurde kritisiert, weil seine Beurteilung immer subjektiv sei und weil *Staph. hyicus* und *Staph. intermedius* in diesem Testsystem keine positiven Ergebnisse zeigten.

GOLDSTEIN und ROBERTS (1982) empfahlen den "microtube coagulase test". Sie erhielten bei 339 Stämmen aus humanmedizinischem Untersuchungsmaterial 99% richtige Ergebnisse innerhalb von vier Stunden. Der konventionelle Röhrchentest mit EDTA-Plasma erbrachte in demselben Zeitraum 98% richtige Ergebnisse.

DOERN (1982) verglich einen Latex-Agglutinations-Test mit dem konventionellen Röhrchenkoagulasetest. Mit beiden Tests wur-

den 159 von 160 Staph. aureus Stämmen richtig identifiziert. MYRICK und ELLNER (1982) hielten die Interpretation des Koagulasetests, solange keine vollständige 4+ Verklumpung vorlag, für subjektiv. Ebenso konnten durch Verwendung von Plasma bestimmter Tierarten falsch positive Ergebnisse entstehen. Die Anwendung des Koagulasetests als Standardmethode wurde nicht befürwortet.

RAUS und LOVE (1983) führten den Koagulasetest bei 160 Stämmen, hauptsächlich vom Hund und auch von Pferd, Katze und Rind, nach den Empfehlungen des SUBCOMMITTEE ON TAXONOMY OF STAPHYLOCOCCI AND MICROCOCCI (1965) durch. Sie differenzierten 27 Staph. aureus-Stämme und 115 ebenfalls koagulasepositive Staph. intermedius-Stämme. Der Rest war koagulasenegativ.

URBANCZIK (1984) differenzierte Staph. aureus aus humanen Urinproben auf Grund eines positiven Clumping factor Tests (Staphyslide, bioMerieux) und Röhrchenkoagulasetests mit Kaninchenplasma (bioMerieux). Alle Stämme waren positiv in beiden Proben, zeigten aber nur zu 60% Hämolyse auf Schafblutagar und zu 50% gelbliche Pigmentbildung.

DEVRIESE (1984) testete 94 Staph. aureus-Stämme von boviner Mastitis. Im Röhrchenkoagulasetest zeigten sie innerhalb von sechs Stunden eine 4+ Reaktion, wenn 0,5 ml eines 1:3 verdünnten Rinderplasmas verwendet wurden. Er benutzte Hämolyseröhrchen mit 10 mm Durchmesser. Bei einer 1:10

Verdünnung zeigten sich nur noch 1+ und 2+ Reaktionen, die als negativ gewertet wurden. Benutzte der Autor 1ml Plasma anstatt 0,5 ml, so stieg die Anzahl der positiven Reaktionen. HODGES und Mitarb. (1984) untersuchten in Neuseeland 900 Milchproben von Kühen. Sie erhielten 810 Staph. aureus-Isolate. Eine klinische Mastitis konnte bei 30,6% der koagulasepositiven und bei 15,3% der koagulasenegativen Stämme nachgewiesen werden. Eine subklinische Mastitis war bei 92,7% der koagulasepositiven und bei 37,5 % der koagulasenegativen Stämme nachweisbar.

JASPER und Mitarb. (1985) zogen zur Identifizierung von Staph. aureus aus Milchproben mindestens zwei aus folgenden drei Testergebnissen heran: die β - oder $\alpha\beta$ -Hämolysinproduktion, die Plasmakoagulasereaktion und den Thermo-nukleasetest. Die Röhrchenkoagulase wurde mit Kaninchenplasma (Difco) durchgeführt. Von 203 getesteten Stämmen waren 96,6% der Staph. aureus positiv in allen drei Tests. Der Röhrchenkoagulasetest und der Hämolysetest waren jeweils zu 99% positiv bei allen Isolaten. Die Autoren erachteten diese Verfahren als für die Routine ausreichend. Die koagulasepositiven Staph. intermedius und Staph. hyicus seien auf Grund ihrer geringen Häufigkeit in Milchproben zu vernachlässigen.

BERKE und TILTON (1986) erzielten bei 186 humanen Stämmen im Röhrchenkoagulasetest im Vergleich zu im Handel angebotenen

Latex-Agglutinations-Tests und Hämagglutinations-Tests annähernd dieselben Ergebnisse. Im Röhrchenkoagulasetest wurden 99,2% der Staph. aureus-Stämme korrekt identifiziert.

BECKER und Mitarb. (1986) untersuchten 267 Staph. aureus-Stämme aus Viertelgemelksproben. Für den Röhrchenkoagulasetest verwendeten sie 0,1ml beimpfte Bouillonkultur und 0,3ml EDTA-Kaninchenplasma (Difco). Sie erhielten die meisten Ergebnisse bereits nach vier Stunden. 83,5% der Staph. aureus-Stämme waren positiv im Röhrchenkoagulasetest und im Clumping factor Test. 15,7% waren koagulasepositiv und Clumping factor negativ und 0,7% koagulasenegativ und Clumping factor positiv. Es wurde darauf hingewiesen, daß der Clumping factor und die Staphylokoagulase bei Staph. aureus nicht immer übereinstimmen.

2.2.2. Clumping factor

Über die Agglutination von Staphylokokken durch Bestandteile des Säugetierblutplasmas berichtete BIRCH-HIRSCHFELD (1934). Sie stellte fest, daß die Eigenschaft der Staphylokokken, Zitratplasma zur Gerinnung zu bringen (Plasmakoagulase), parallel geht mit einer positiven Agglutinationsreaktion (Clumping factor Reaktion).

Zur Agglutination wird ein Tropfen Plasma mit einer geringen Menge einer 24 Stunden bebrüteten Staphylokokkenkultur auf

einem Objektträger verrieben. Bei positivem Ausfall der Agglutination tritt sofort Verklebung und Brockenbildung ein. Im negativen Fall entsteht eine milchige Emulsion. Die agglutinierende Wirkung des Plasmas wurde seinem Gehalt an Prothrombin zugeschrieben. Die Autorin empfahl die Agglutinationsprobe als ein einfaches Verfahren zur Differenzierung von Staphylokokken.

CADNESS-GRAVES (1943) beschrieb anhand von 442 Staphylokokkenstämmen aus humanpathogenen Quellen den Clumping factor Test auf dem Objektträger. Koagulasepositive Staphylokokken bilden, mit humanem Zitratplasma vermischt, innerhalb von 5-15 Sekunden deutlich sichtbare weiße Klumpen. Die Autorin erhielt bei 440 Stämmen übereinstimmende Ergebnisse mit dem Röhrchenkoagulasetest. Sie hielt den Clumping factor (CF) Test für eine schnelle Methode, um Staph. aureus zu identifizieren. Bei einem negativen Testergebnis sollte der Röhrchenkoagulasetest zusätzlich durchgeführt werden.

FIELD und SMITH (1945) führten den CF-Test mit 124 Staphylokokkenstämmen aus bovinen Milchproben nach der Methode von CADNESS-GRAVES (1943) durch. Alle pathogenen Staphylokokken koagulierten bovines Plasma. Am besten eignete sich reines Fibrinogen für den Objektträgertest.

DUTHIE (1954) schrieb den Vorgang der Plasma-Agglutination der gebundenen Koagulase (Clumping factor) zu. Diese befindet sich auf der Zelloberfläche von koagulasepositiven Staphylo-

kokken und wirkt direkt auf das Fibrinogen. In Folge der Fibrinogenpräzipitation an der Oberfläche der Zellen kommt es zur Verklumpung der Staphylokokken. Am besten eignete sich Plasma von Hund, Maus, Mensch und Kaninchen.

DUTHIE (1955) hat zum Nachweis der gebundenen Koagulase, die er jetzt auch Clumping factor nennt, 0,2 ml einer Kultursuspension mit 0,2 ml verdünntem Fibrinogen im Röhrchen gemischt und kräftig geschüttelt. Nach vier Minuten wurde der Verklumpungsgrad beurteilt. Der Autor wies darauf hin, daß ungewiß pathogene Staphylokokken, die freie Koagulase produzieren, keinen Clumping factor besitzen oder umgekehrt.

ROTTER und KELLY (1966) stellten anhand von Verklumpungsinhibitionstests fest, daß der CF bei serologisch unterschiedlichen Staphylokokkenstämmen antigenetisch ähnlich ist. Antiseren der CF-positiven Stämme unterdrückten die Verklumpungsreaktion aller anderen von den Autoren getesteten Stämme.

HEESCHEN und Mitarb. (1970) haben insgesamt 1549 Staphylokokkenstämmen aus Rinderherden untersucht. 978 Stämme zeigten eine positive Koagulasereaktion. Die Koagulasereaktion wurde mit Kaninchen- sowie Rinderplasma durchgeführt, wobei die Ergebnisse nur bedingt vergleichbar waren. Der CF-Test erfaßte 99% aller koagulasepositiven Stämme.

KROIHER (1967) untersuchte 2796 Viertelgemelksproben von 700 laktierenden Kühen aus verschiedenen Herden Oberbayerns und

erhielt im CF-Test mit Rinderplasma 96,8% Übereinstimmung mit dem Plasmakoagulasetest. Er empfahl den CF-Test als Ersatz für die aufwendigere Koagulasereaktion.

MORTON und COHN (1972) verglichen den Objektträgertest mit dem Röhrchenkoagulasetest anhand von humanmedizinischem Untersuchungsmaterial. Nur 68 % der koagulasepositiven Stämme waren auch im Objektträgertest mit EDTA-Kaninchenplasma positiv. 82 % der koagulasepositiven Stämme waren CF- positiv mit humanem EDTA- Plasma. Die Übereinstimmung der Testergebnisse für die Koagulaseproduktion und den CF war nicht zufriedenstellend.

ZAJDEL und Mitarb. (1973) grenzten die CF-Reaktion deutlich von der Aktivität der Staphylokoagulase ab. Beide Faktoren sind antigenetisch unterschiedlich. Andere Benennungen für den CF und die entstehende Reaktion, wie gebundene Koagulase oder Plasmaagglutination, die eine immunologische oder Blutgerinnungsreaktion implizieren, hielten die Autoren für ungeeignet.

SWITALSKI (1976) hat mit verschiedenen Methoden den CF extrahiert und gereinigt. Der CF ist Bestandteil der Zellwand. Er stellt ein Protein oder einen Peptidkomplex mit antigenen Eigenschaften dar. Der CF-Test war eine brauchbare Methode, um die Pathogenität von Staphylokokken zu bestimmen, wenngleich es sich wahrscheinlich nicht um einen Faktor handelt, der für die Virulenz verantwortlich ist.

BRÜCKLER und Mitarb. (1974) extrahierten den CF von *Staph. aureus* mit wasserfreier Ameisensäure und führten mit Cellulosephosphat eine partielle Reinigung durch. Der gereinigte CF erwies sich bei der isoelektrischen Fokussierung als stark basisches Protein mit einem isoelektrischen Punkt im pH- Bereich von 10,2 - 10,7. Die CF- Aktivität konnte mit Fibrinogen beladenen Schafererythrozyten quantitativ bestimmt werden. HAJEK und MARSALEK (1976) wiesen in ihrer Arbeit darauf hin, daß die *Staph. aureus* Biotypen A bis D (HAJEK und MARSALEK 1971, 1973) durch das Vorhandensein des CF charakterisiert sind.

DEVRIESE und OEDING (1976) untersuchten 544 Staphylokokkenstämme von Mensch und Tier. Alle humanen, bovinen und porcinen Stämme konnten anhand der positiven Reaktionen im CF- Test, Staphylokoagulasetest und DNasetest als *Staph. aureus* identifiziert werden. DEVRIESE empfahl den CF- Test als zuverlässig und leicht durchführbar, um *Staph. aureus* zu identifizieren.

BRÜCKLER und Mitarb. (1981a) untersuchten *Staph. aureus* verschiedener Herkunft. Der CF-Test in Mikrotitrierplatten eignete sich mit Plasma- oder Fibrinogenpräparationen zur vorläufigen Identifizierung von *Staph. aureus*. So ergaben alle 100 getesteten *Staph. aureus*- Kulturen vom Menschen stark positive Reaktionen mit EDTA- Plasma von Mensch, Kaninchen, Schwein, Rind und Hund, sowie Fibrinogen von Mensch und Rind.

Ebenso verklumpten alle 100 getesteten Staph. aureus-Stämme vom Rind in Plasma von Schwein, Rind und Mensch, sowie zu 98 % in Menschen- und Rinderfibrinogen und zu 97 % in Kaninchenplasma. Mit Plasma von Schaf und Ziege reagierte dagegen nur ein Teil der CF positiven Staph. aureus-Kulturen.

KROEMER und Mitarb. (1977) erhielten für die Bestimmung des CF in Mikrotitrierplatten eindeutigere Ergebnisse als im Röhrchenkoagulasetest.

Bei BRÜCKLER und Mitarb. (1981b) bewährte sich der CF-Test auf dem Objektträger mit unverdünntem Kaninchenplasma als schnelles und zuverlässiges Verfahren zur routinemäßigen Erkennung von Staphylokokken aus 1984 Rindermilchproben.

BLOBEL (1977) führte die vorläufige Identifizierung von Staph. aureus durch die Feststellung der Hämolyse bei der Anzucht und durch den Nachweis der Plasmakoagulase bzw. des CF durch.

BLOBEL und Mitarb. (1976, 1977, 1981) stellten fest, daß der an die Oberfläche pathogener Staphylokokken gebundene CF die Verklumpung dieser Bakterien in Plasma verursacht. Die Verklumpung verzögerte die Phagozytose und könnte somit für die Pathogenität der Staphylokokken von Bedeutung sein. Der Grad der Beeinflussung der Phagozytose hängt von der Aktivität des CF ab.

HASCHE und Mitarb. (1975) stellten fest, daß CF-positive Staphylokokken in wesentlich geringerem Maße von Leukozyten vom

Kaninchen und Rind phagozytiert wurden als CF-negative. Die Beobachtungen in vitro wurden durch entsprechende Phagozytoseversuche in künstlichen Körperhöhlen von Kaninchen weitgehend bestätigt. Der CF schien durch die Verklumpung der Staphylokokken deren Einverleibung in die Phagozyten zu erschweren.

DEVRIESE und HAJEK (1980) bevorzugten den CF-Test gegenüber dem Staphylokoagulasetest, um Staph. aureus zu diagnostizieren. Sie benutzten unverdünntes Koloniematerial auf einem Glasobjektträger mit Plasma von verschiedenen Tieren.

ESSERS und RADEBOLD (1980a) untersuchten Staph. aureus aus humanmedizinischen Quellen. Der Objektträgertest ließ bei Verwendung von Humanplasma an Treffsicherheit zu wünschen übrig. Die Ergebnisse mit Kaninchenplasma lagen etwas besser.

SHANHOLTZER und PETERSON (1982) verglichen in ihrer Arbeit den CF-, den Koagulase-, den DNase- und den Thernonukleasetest, um Staph. aureus zu identifizieren. Sie wiesen darauf hin, daß die bisherige Empfehlung, negative CF - Ergebnisse durch den Koagulasetest zu bestätigen, zu falschen Ergebnissen führen kann, weil auch koagulasenegative Stämme den CF besitzen können.

Dagegen stellten DEVRIESE und Mitarb. (1985) fest, daß alle koagulasenegativen Stämme auch keinen CF besaßen. Sie untersuchten 661 koagulasenegative Stämme von verschiedenen Tieren, darunter 189 Isolate von bovinen Milchproben.

BIBERSTEIN und Mitarb. (1984) erhielten für alle Staph. aureus-Isolate vom Rind einen positiven CF.

ESSERS und RADEBOLD (1980b) empfahlen die Verwendung eines Latex-Agglutinations-Testes für die Routinediagnostik von Staph. aureus. Bei diesem Test wird gleichzeitig der CF und das Protein A nachgewiesen, denn das Plasma enthält sowohl Fibrinogen als auch Immunglobulin G, welche mit der gebundenen Koagulase bzw. Protein A reagieren. Die Latexsuspension wird mit humanem Plasma vermischt und dann zusammen mit etwas Koloniematerial auf einen Glasobjektträger gebracht und rotierend bewegt. Die Reaktion kann sofort abgelesen werden.

MYRICK und ELLNER (1982) verglichen den Latex-Agglutinations-Test (SeroSTAT, Staphylococcus Test, Scott) mit dem Objektträgertest und dem Plasmakoagulasetest. Dieser Latex-Agglutinations-Test unterschied sich von dem von ESSERS und RADEBOLD (1980b) beschriebenen dadurch, daß die Latexpartikel mit EDTA-Kaninchenplasma bedeckt waren, anstatt mit humanem Plasma. 98,3 % der koagulasepositiven Stämme waren auch im Latextest positiv. Der neue Test wurde als brauchbare Methode empfohlen, um Staph. aureus nachzuweisen und die konventionellen Tests zu ersetzen.

Auch DOERN (1982) untersuchte den Latex-Agglutinations-Test der Firma Scott Laboratories mit 160 human-pathogenen Stämmen. 99,4 % der Staph. aureus-Stämme wurden damit erfaßt. JASPER und Mitarb. (1984) führten den Standard-Röhrchentest

mit Kaninchenplasma im Vergleich zum Latex-Agglutinations-Test nach der Methode von ESSERS und RADEBOLD (1980b) sowie dem Sero STAT Staph Latextest durch.

Nur 50% der koagulasepositiven Staphylokokken von bovinen Milchproben und 5% der koagulasenegativen wurden in den Latex-tests identifiziert.

FLANDROIS und CARRET (1981) untersuchten die Fibrinogenaffinität von 580 humanen Staphylokokkenstämmen unter Verwendung sensibilisierter Schafererythrozyten. Der CF wurde mit dem Objektträgertest nach CADNESS-GRAVES (1943) und der passiven Hämagglutinationsreaktion bestimmt. Für letztere verwendeten die Autoren mit menschlichem Fibrinogen sensibilisierte Schafererythrozyten. Nicht sensibilisierte Erythrozyten dienten als negative Kontrolle. Durch das Zusammenwirken der CF-positiven Staphylokokken mit den sensibilisierten Erythrozyten tritt innerhalb von 15 Sekunden eine Verklumpung auf. Der Hämagglutinationstest war genauer als der Objektträgertest. Menschliches Plasma kann neben Fibrinogen und verwandten Produkten verschiedene andere Substanzen enthalten, die mit den Staphylokokken reagieren können und damit zu falsch positiven Ergebnissen führen.

CARRET und Mitarb. (1982) testeten erneut 1619 humanpathogene Staphylokokkenstämmen. Mit dem passiven Hämagglutinationstest konnten sie 98,8 % der Staph. aureus Stämme identifizieren.

Kürzlich wurde von der Fa. bioMerieux der Staphyslide Test

eingeführt. Es handelt sich dabei um einen passiven Hämagglutinationstest. Durch Fibrinogen sensibilisierte Hammelerythrozyten werden in Gegenwart eines Staph. aureus-Stammes agglutiniert. Als Untersuchungsmaterial dienten BOUWMAN und VINCENTIE (1984) Staphylokokkenstämme von verschiedenen Lebensmitteln. 92,9% der koagulasepositiven Stämme reagierten im Staphyslide Test positiv.

URBANCZIK (1984) hat Staph. aureus aus humanen Urinproben auf Grund eines positiven Ergebnisses mit dem Staphyslide Test und dem Röhrchenkoagulasetest identifiziert. Der Staphyslide Test führte zu zuverlässigen und schnellen Ergebnissen. Alle Stämme waren in beiden Proben positiv.

PENNELL und Mitarb. (1984) testeten drei im Handel erhältliche Agglutinationstests im Vergleich zum konventionellen Röhrchenkoagulasetest an humanmedizinischem Untersuchungsmaterial. Sero STAT Staph (SCOTT Laboratories), Staphylatex (American Micro Scan) und Staphyloslide (BBL Microbiology System) erbrachten 98,8% Übereinstimmung mit dem Röhrchenkoagulasetest.

ALDRIDGE und Mitarb. (1984) verglichen den Röhrchenkoagulasetest mit vier serologischen Schnellverfahren. Die kommerziellen Testkits zeigten eine gute Übereinstimmung mit dem Röhrchenkoagulasetest. Der Staphyloslide Test identifizierte alle Staph. aureus-Stämme und zeigte zwei falsch positive Resultate. Auch der Sero STAT Staph-, der

ACCU-Staph- und der Staphylol latex-Test erwiesen sich als geeignet zur Identifizierung von Staph. aureus. Die Spezifität des Antiserums in jedem Test war gegen den Clumping factor oder gegen Protein A oder gegen beides gerichtet. Der Grund für negative oder schwach positive Reaktionen war unklar. Eventuell war die unterschiedliche Quantität dieser Komponenten an der Zelloberfläche der Staph. aureus-Stämme dafür die Ursache.

JUNGKIND und Mitarb. (1984) untersuchten Staph. aureus-Isolate aus menschlichem Material. Der API STAPHase Test (Analytab Products Inc.) und Sero STAT Staph Test, sowie der Objektträger test mit EDTA-Kaninchenplasma erbrachten jeweils 95,9%, 95,4% und 95,9% Übereinstimmung mit dem Röhrchenkoagulasetest. Die Testsysteme wurden von den Autoren empfohlen.

BAKER und Mitarb. (1985) verglichen einen Latex-Agglutinations-Test (Sero STAT Staph) und zwei Hämagglutinationstests (Staphyloslide und Hemastaph der Firma REMEL) mit dem Objektträger- und Röhrchenkoagulasetest. Objektträger test, Röhrchentest, Sero STAT Staph, Staphyloslide und Hemastaph identifizierten jeweils 87,9%, 92,5%, 99,6%, 100% und 98,7% der Staph. aureus-Isolate korrekt.

Auch BERKE und TILTON (1986) untersuchten verschiedene Schnellverfahren zur Identifizierung von Staph. aureus. In den beiden Hämagglutinationstests Staphyloslide und Hemastaph

ergaben 98,3 und 93,2% der Staph. aureus-Stämme ein richtiges Ergebnis. Bei allen kommerziellen Testsystemen entstanden falsch positive und falsch negative Resultate. Es wurde empfohlen, negative Ergebnisse in den Testsystemen durch den Röhrchenkoagulasetest zusätzlich zu bestätigen.

BECKER und Mitarb. (1986) identifizierten 267 Staph. aureus-Stämme aus Rindermilchproben mit dem konventionellen Objektträger-test, dem Staphyslide Test, dem Staph-Rapid-Test (Fa. ROCHE) und dem Sero STAT (SCOTT Laboratories). Hinsichtlich der Empfindlichkeit bestanden kaum Unterschiede zwischen dem Objekträger-test und den übrigen Testsystemen. Verdächtige, negative Isolate sollten nach Meinung der Autoren mit dem Koagulasetest nachuntersucht werden.

2.2.3. Hämolysine

Die Unterscheidung der hämolysierenden Eigenschaften der Staphylokokken gründet sich auf ihre spezifische Wirkung auf die Erythrozyten verschiedener Tierarten sowie auf die Hemmung der Hämolysen durch Antiseren gegen Staphylokokkenhämolysine. Anhand der Hämolysinbildung wird seit langem die Pathogenität der Staphylokokken beurteilt. CHAPMAN und Mitarb. (1937) und FIELD und SMITH (1945) untersuchten die Hämolysine ihrer koagulasepositiven Staphylokokkenstämme auf Kaninchen- und Schafblutagar.

Die Hämolsine der Staphylokokken sind Exotoxine mit Eiweißcharakter und haben antigene Eigenschaften. Sie können neutralisiert und präzipitiert werden.

Sie unterscheiden sich in ihrem hämolytischen Spektrum, haben einen ähnlichen isoelektrischen Punkt und teilweise auch ein ähnliches Molekulargewicht (MÖLLBY und WADSTRÖM, 1973).

GEDEK (1972) führte folgende Einteilung der Hämolsine durch: Das α -Hämolysin lysiert die Erythrozyten von Kaninchen, Rind, Schaf und Ziege. Es entsteht eine weite Hämolysezone mit unscharfem Rand. Meist wird das α -Hämolysin jedoch durch Beimpfung von Agarplatten mit Zusatz gewaschener Kaninchenerythrozyten unter Verwendung eines mit Anti- α -Hämolysin getränkten Papierstreifens nachgewiesen. Das Anti- α -Hämolysin hemmt spezifisch das α -Hämolysin.

Das β -Hämolysin greift die Erythrozyten von Rind, Ziege und Schaf an. Es wird durch hot-cold-lysis identifiziert. An die Bebrütung schließt sich ein Aufenthalt in der Kälte an. Die zunächst nur bräunlich verfärbte, scharf begrenzte Zone zeigt dann eine vollständige, klare Hämolyse.

Nach BLOBEL (1977) produzieren pathogene Staphylokokken das α - und β -Hämolysin. Die Kolonien sind von einer inneren Zone mit kompletter Hämolyse (α -Hämolysin) und einer äußeren mit partieller Hämolyse (β -Hämolysin) umgeben.

Das δ -Hämolysin zeigt seine hämolytische Wirkung bei Erythrozyten von Schaf, Kaninchen, Mensch, Affe, Pferd, Meerschwein,

Ratte und Maus. Im Plattentest zeigt sich eine schmale, gut abgegrenzte Hämolysezone.

Das ϵ -Hämolysin bildet weite Hämolysezonen auf Agar mit Zusatz von Schaf- oder Kaninchenerythrozyten. Das ϵ -Hämolysin wird in der Literatur nur im Zusammenhang mit koagulasenegativen Staphylokokken beschrieben (ELEK und LEVY, 1950; REID und WILSON, 1959; ABO ELNAGA und KANDLER, 1965a; JASPER und JAIN, 1966).

HODGES und Mitarb. (1984) konnten die ϵ -Hämolysinbildung bei 47,6% der koagulasenegativen Staphylokokken nachweisen. Sie untersuchten speziell 70 Staph. aureus-Stämme auf die ϵ -Hämolysinbildung und konnten sie in keinem Fall beobachten.

ELEK und LEVY (1950) untersuchten 359 Staphylokokken aus humanem und tierischem Material. Die Hämolysinbildung wurde auf Agarplatten mit Erythrozyten von Kaninchen und Schaf beobachtet.

Ein Filterpapierstreifen wurde mit Antitoxin getränkt und auf das Testmedium gelegt. Der zu testende Stamm wurde im rechten Winkel zum Papierstreifen auf die Agarplatte geimpft.

Der Abstand der entstehenden Neutralisationszone vom Filterpapierstreifen war abhängig von der Konzentration des jeweiligen Antihämolysins. Es konnten mit dieser Methode auch mehrere Hämolysine gleichzeitig demonstriert werden. Die humanen koagulasepositiven Staphylokokkenstämme zeigten am häufigsten das α - und δ -Hämolysin und die α -, β -, δ -Hämo-

lysinkombination am zweithäufigsten.

Das β -Hämolysin war für tierische Stämme charakteristisch. Hier wurde am häufigsten die α -, β -, δ -Kombination, gefolgt von der β -, δ -Kombination festgestellt. Koagulasenegative Stämme produzierten diese drei Hämolysine nicht, aber viele von ihnen zeigten das ϵ -Hämolysin.

REID und WILSON (1959) untersuchten *Staph. aureus* von boviner Mastitis nach ELEK und LEVY (1950) und erhielten in der Mehrzahl eine kombinierte α -, β -, δ -Hämolysinbildung.

Ebenso beobachteten SCHALM und WOODS (1959) die kombinierte α - und β -Hämolysinbildung bei *Staph. aureus* aus bovinen Milchproben. Die klare α -Hämolysinzone mit einem Radius von ungefähr 1 mm wurde von einer 4 mm breiten Zone umgeben, die nach Kühlshrankaufenthalt ebenfalls klar wurde (hot-cold-lysis).

MUNCH-PETERSEN (1960) und MUNCH-PETERSEN und GARDINER (1965) erhielten in ihren Untersuchungen mit Stämmen von boviner Mastitis bei 90,8% der koagulasepositiven Stämme auch eine β -Hämolysinbildung.

MESSER (1961) prüfte das Hämolysinbildungsvermögen von 384 Staphylokokkenstämmen aus bovinen Milchproben. 93,9% der koagulasepositiven Stämme zeigten nach ELEK und LEVY (1950) die Bildung von Hämolysinen auf 5%igem Hammelblutagar. Davon war bei 90,6% eine Kombination aus α -, β - und δ -Hämolysin festzustellen.

ABO ELNAGA und KANDLER (1965a) konnten bei allen koagulase-positiven Staphylokokkenstämmen aus verschiedenen Milchproben das α -, β - oder δ -Hämolysin einzeln oder in Kombination nachweisen. Die Hämolysinbildung wurde auf Menschen-, Kaninchen- und Hammelblutagar nach ELEK und LEVY (1950) geprüft.

TERPLAN und GEDEK (1965), GEDEK (1966), GEDEK und KOPP (1967) und GEDEK (1972) stellten in ihren Untersuchungen mit Viertelgemelksproben von Kühen fest, daß koagulasepositive Staphylokokken β -Hämolysinbildner sind. Sie untersuchten die Hämolysinbildung auf 7%igem Rinder- und Schafblutagar. 86,7% der bovinen Staph. aureus-Stämme bildeten kombiniert das α -, β - und δ -Hämolysin.

JASPER und JAIN (1965, 1966) untersuchten das Hämolysemuster von Staphylokokken, die aus bovinen Milchproben stammten. Sie verwendeten Blutplatten, die mit 5% gewaschenen Erythrozyten von Rind, Schaf, Pferd oder Kaninchen hergestellt wurden. Die Hämolysinbildung war besser zu beurteilen, wenn die Blutplatten bei 37°C und einer Kohlendioxidkonzentration von 30% inkubiert wurden. Vor allem die α -Hämolysinproduktion wurde dadurch verstärkt. Sehr gute Ergebnisse waren zu erzielen, wenn der Impfstrich senkrecht zu einem bekannten β -Hämolysinbildner verlief.

HEESCHEN und Mitarb. (1970) untersuchten 978 Stämme aus bovinen Viertelgemelksproben auf 5%igem Rinderblutagar. 618

Stämme produzierten α - und β -Hämolysin, 306 nur β - und 54 nur α -Hämolysin.

DEVRIESE und OEDING (1976), DEVRIESE und HOMMEZ (1975) und HAJEK und MARSALEK (1976) beobachteten nach ELEK und LEVY (1950) bei allen Staph. aureus-Stämmen aus Mastitismilch eine α -, β - und δ -Hämolysinbildung.

DEVRIESE (1979, 1984) und DEVRIESE und HAJEK (1980) schrieben in ihren Arbeiten mit Milchproben vom Rind den typischen β -Hämolysineffekt auf 5%igem Schaf- oder Rinderblutagar eindeutig Staph. aureus zu, wenn es sich um einen pigmentierten Stamm handelte.

OBIGER (1960) verglich in seiner Arbeit Staphylokokkenstämme von humanem und bovinem Ursprung. Er stellte fest, daß beim Menschen mehr α -Hämolysinbildner und beim Rind mehr β -Hämolysinbildner vorkommen. Ebenso brachten JASPER und JAIN (1966) und HAJEK und MARSALEK (1976) das α -Hämolysin in Verbindung mit pathogenen Stämmen humanen Ursprungs und MARSALEK und HAJEK (1973) sowie ELEK und LEVY (1950) das β -Hämolysin mit Staphylokokken von tierischem Ursprung. GEDEK (1968) wies in den meisten Fällen eine α -, δ -Hämolysinkombination bei humanen Stämmen nach. Nur 7,5% der humanen Stämme bildeten im Vergleich zu 97,8% der bovinen Stämme β -Hämolysin.

NAIDU und NEWBOULD (1975) machten Euterinfusionen mit rohem β -Hämolysin, das von Staph. aureus stammte. Dies führte zu

einer akuten Mastitis. Die Heftigkeit der Entzündung war der verabreichten Menge des infundierten Hämolysins ungefähr proportional.

Auch BECKER und Mitarb. (1986) hielten das Vorkommen des β -Hämolysins für typisch für Staph. aureus-Isolate vom Rind. ESSERS und RADEBOLD (1980a) wiesen in ihrer Untersuchung darauf hin, daß Pigment- und Hämolysinbildung in 76% der Fälle zur richtigen Diagnose führten. BRÜCKLER und Mitarb. (1981b) stellten bei 97,4% der Staph. aureus aus Milchproben vom Rind eine Hämolysinbildung fest.

HODGES und Mitarb. (1984) registrierten die Hämolysinbildung von koagulasepositiven Staphylokokken aus bovinen Milchproben auf 3%igem Rinder- oder Pferdeblutagar. 98,3% der koagulasepositiven und 60% der koagulasenegativen Staphylokokken zeigten eine α -, β - oder δ -Hämolysinbildung. 47% der Staph. aureus bildeten das α -, β - und δ -Hämolysin kombiniert.

DEVRIESE und Mitarb. (1985) isolierten koagulasenegative Staphylokokken von Rind, Schwein, Geflügel, Schaf und Ziege. Es konnte kein β -Hämolysinbildner nachgewiesen werden.

Bei JASPER und Mitarb. (1985) waren 99% von 203 Staph. aureus-Stämmen aus boviner Milch α - oder α , β -Hämolysinbildner. Die Autoren hielten die Beobachtung der Hämolysinbildung von Staph. aureus aus Milch als diagnostisches Kriterium für gut geeignet.

GUDDING und NESS (1985) konnten bei 23% der bovinen Staph. aureus-Stämme keine Hämolysinbildung feststellen.

BECKER und Mitarb. (1986) beurteilten die Hämolysinbildung von 623 Staphylokokkenstämmen aus Rinderviertelgemelksproben auf Columbiaagar (OXOID) mit 5% Rinderblut. 54% der Staph. aureus zeigten eine α - und β -Hämolyse. 33,7% zeigten eine α - oder β -Hämolysinbildung. Da die Einwirkungen von α - und δ -Hämolysin nach den Autoren nicht sicher voneinander abgrenzbar sind, wurden alle vollständigen Hämolysen als α -Hämolysinwirkung aufgeführt. Das Vorkommen des β -Hämolysins wird als typisch für Staph. aureus-Isolate vom Rind bezeichnet.

2.2.4. Pigmentbildung

Die Pigmentbildung der Staphylokokken steht in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Atmosphäre, des Nährbodens sowie von der Temperatur und dem Lichtzutritt (GEDEK, 1972). In der Literatur bestehen unterschiedliche Meinungen über den Zusammenhang zwischen Pathogenität und Pigmentbildung.

CHAPMAN und Mitarb. (1937) beurteilten die Pathogenität eines Staphylokokkenstammes nach der Stärke seiner Pigmentierung. Allerdings stellten sie fest, daß 13% der nicht pigmentierten, d.h. weiß gefärbten Stämme, auch pathogen waren. Jedoch sprachen sich FIELD und SMITH (1945) gegen die Patho-

genitätsbeurteilung anhand der Pigmentbildung aus. Sie hielten die Farbdifferenzierung für schwierig.

REID und WILSON (1959) stellten bei ihren Untersuchungen zur Pigmentbildung von Staphylokokkenstämmen fest, daß Stämme, die eine akute bovine Mastitis verursachten, orangefarbenes oder gelbes Pigment produzierten. Stämme von chronischer Mastitis oder von unveränderten Eutern bildeten orangefarbenes, gelbes, cremefarbenes oder weißes Pigment. Insgesamt produzierten 57% der Stämme von normalen Eutern ebenfalls orangefarbenes oder gelbes Pigment. Deshalb wurde empfohlen, die Pigmentbildung nicht als Pathogenitätskriterium heranzuziehen.

MESSER (1961) vertrat auch die Auffassung, daß die Pigmentbildung nicht zur Differenzierung von Staphylokokken herangezogen werden sollte. 91,9% der koagulasepositiven Stämme wiesen das charakteristische gelbe Pigment auf, wie es bei den pathogenen Staphylokokkenstämmen vorkommen soll. Gelbes Pigment war jedoch auch bei 39,8% der koagulasenegativen Stämme vorhanden.

MOSSEL (1962) stellte bei 50% der koagulasepositiven und -negativen Staphylokokkenstämmen aus human- und tiermedizinischem Untersuchungsmaterial eine schwach gelbe Pigmentierung fest. 13% der Staph. aureus-Stämme waren pigmentlos (weiß). Auf Grund dieser Ergebnisse hielt er die Pigmentbildung zur Klassifizierung der Staphylokokken für ungeeignet.

Bei ABO ELNAGA und KANDLER (1965a) war unter 97 aus Kuhmilch isolierten koagulasepositiven Staphylokokkenstämmen kein einziger pigmentlos und nur neun Stämme waren elfenbeinfarben, alle anderen waren gelb oder orangefarben. Unter 68 koagulasenegativen Stämmen zeigten nur zwei eine deutliche Pigmentierung. Auf Grund dieser Ergebnisse stellten die Autoren fest, daß gelbe oder orangefarbene Pigmentierung bei Staphylokokkenstämmen ebenso sicher ein Merkmal für Pathogenität sei wie ein positives Ergebnis der Koagulaseprobe, während völlige Pigmentfreiheit mit der gleichen Wahrscheinlichkeit apathogene Stämme anzeige wie ein negatives Ergebnis der Koagulaseprobe. Elfenbeinfarbene Pigmentierung zeigten sowohl pathogene wie auch apathogene Stämme.

GEDEK und KOPP (1967) untersuchten 225 Staph. aureus-Stämme aus Kuhmilch und stellten bei 95,6% Pigmentbildung auf Eigelbagar und bei 89,3% auf Milchagar fest.

HEESCHEN und Mitarb. (1970) konnten bei 1549 Staphylokokkenstämmen aus bovinen Viertelgemelksproben keinen Zusammenhang zwischen Pigmentbildung und Euterpathogenität feststellen. Nur 28,6% der Stämme bildeten auf Eigelbagar goldfarbenes Pigment.

GEDEK (1972) untersuchte vergleichend die Pigmentbildung von 225 Staph. aureus-Stämmen auf Eigelbagar, Milchagar und Glycerinmonoacetatagar. Nach 48 stündiger Bebrütung war das Pigment der Stämme auf Glycerinmonoacetatagar klar zu bestimmen.

Es erwiesen sich zwei Pigmenttypen als voneinander unterscheidbar, nämlich weiß ohne jede Gelbfärbung und gelb in verschiedenen Stärken. 197 Stämme konnten übereinstimmend dem gelben und acht dem weißen Typ zugeordnet werden.

KLOOS und Mitarb. (1974, 1976a, 1976b) teilten Staphylokokken, die sie von humaner Haut isolierten, anhand verschiedener morphologischer, physiologischer, biochemischer und genetischer Charakteristika ein und zogen dabei auch die Pigmentbildung als Kriterium zur Charakterisierung eines Stammes heran.

DEVRIESE und HAJEK (1980) wiesen in ihrer Arbeit darauf hin, daß die meisten Staph. aureus-Stämme von Mensch und Tier pigmentiert sind. Allerdings könnten sie die Fähigkeit, Pigment zu produzieren, in vitro verlieren. Die Autoren hielten es für wertvoll, die Pigmentbildung als Differenzierungsmerkmal heranzuziehen, wenn sie zusammen mit dem Clumping factor, der DNase oder β -Hämolysinbildung vorkam. Dabei werden alle gefärbten Kolonien als pigmentiert eingestuft, nur weiß gilt als unpigmentiert.

RAUS und LOVE (1983) erhielten nur pigmentierte Staph. aureus-Stämme aus ihrem veterinärmedizinischen Untersuchungsmaterial.

In den Untersuchungen von ESSERS und RADEBOLD (1980a) mit humanmedizinischem Material waren die Kriterien Pigmentbildung und Hämolyse am wenigsten zuverlässig, um

Staph. aureus zu identifizieren. Sie führten nur in 76% der Fälle zur richtigen Diagnose.

Bei URBANCZIK (1984) zeigten nur 50% der Staph. aureus-Stämme aus humanen Urinproben eine gelbliche Pigmentierung.

BECKER und Mitarb. (1986) untersuchten Staphylokokkenstämme aus Rinderviertelgemelksproben. Ungefähr ein Viertel der Staph. aureus-Isolate zeigte keine typische Pigmentierung und unterschied sich also nicht von den meisten sonstigen Micrococcaceae.

2.3. Lysostaphin - Test

Lysostaphin wurde erstmalig von SCHINDLER und SCHUHHARDT (1964) beschrieben. Sie isolierten Lysostaphin aus einem weiß pigmentierten koagulasenegativen Staphylokokkenstamm.

Lysostaphin ist ein nur gegen Staphylokokken wirksames Enzym von Proteinnatur, das sowohl lebende proliferierende und ruhende als auch abgestorbene Staphylokokkenzellen auflöst (PULVERER 1968a).

Die unterschiedliche Empfindlichkeit der Staphylokokken und Mikrokokken gegenüber Lysostaphin steht in enger Korrelation zu den Peptidoglykanen ihrer Zellwand. Die lytische Aktivität von Lysostaphin wird hauptsächlich durch seine Endopeptidase verursacht, die nur Glycyl-glycin-Peptidbrücken spaltet. Nur Staphylokokken enthalten diese Bindungen. Bei Mikrokokken

dagegen findet man keine Glycinreste in der Interpeptidbrücke des Peptidoglykans (SCHLEIFER und KLOOS, 1976; BROWDER und Mitarb., 1966; KLESIOUS und SCHUHHARDT, 1968; SCHINDLER, 1966).

ZYGMUNT und Mitarb. (1968) prüften humanes Untersuchungsmaterial auf seine Lysostaphin-Empfindlichkeit. Ein $\mu\text{g/ml}$ Lysostaphin führte zu 75%iger Zelllysis bei Staph. aureus-Stämmen innerhalb von 10-15 Minuten.

In der Untersuchung von PULVERER (1968a) hat sich Lysostaphin als außerordentlich gut wirksames Antibiotikum erwiesen. Alle 355 Staph. aureus-Stämme von menschlicher Herkunft wurden mit 5,0 $\mu\text{g/ml}$ Lysostaphin bakterizid gehemmt. Meistens lagen die Hemmwerte bedeutend niedriger.

In seiner Arbeit mit 230 Staphylokokken aus veterinärmedizinischem Untersuchungsmaterial (102 Stämme vom Rind) stellte PULVERER (1968b) ebenfalls eine gute Lysostaphin-Empfindlichkeit fest.

LACHICA und Mitarb. (1971) testeten Micrococcaceae von verschiedener Herkunft im Röhrchen mit 25 $\mu\text{g/ml}$ Lysostaphin. Die Röhrchen wurden zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Als positives Testergebnis galt das völlige Aufklaren des Röhrcheninhalts. Alle 373 Staphylokokkenstämme waren Lysostaphin-empfindlich. Zehn Mikrokokkenstämme waren resistent gegen Lysostaphin. Die Lysostaphin-Empfindlichkeit wurde als brauchbare Untersuchungsmethode empfohlen, um

zwischen dem Genus *Staphylococcus* und dem Genus *Micrococcus* zu unterscheiden.

IVERSEN und GROV (1973) haben drei Enzyme von *Lysostaphin* isoliert und gereinigt. Es handelt sich dabei um die Endo-beta-N-acetyl-glucosaminidase, die Endopeptidase (Glycinase) und die N-Acetylmuramyl-L-alaninamidase. *Lysostaphin* stellt also eine Mischung von autolytischen Enzymen dar (HECZKO und Mitarb., 1976; SCHLEIFER, 1981).

In folgenden Arbeiten wird eine Standardisierung des *Lysostaphin*-Tests beschrieben, die später noch vielfach Verwendung fand: KLOOS und SCHLEIFER (1975,1981), KLOOS und Mitarb. (1974), SCHLEIFER und KLOOS (1975,1976), SCHLEIFER (1981), SCHLEIFER und Mitarb. (1982).

Dabei wird Agar in einer Petrischale mit 3 ml halbfestem (0.3% Agar), beimpftem Agar überschichtet. Auf das erstarrte Medium wird ein Tropfen einer sterilen *Lysostaphin*-Lösung (200 µg/ml) aufgebracht. Die Platten werden 24-48 Stunden bei 37°C inkubiert. Eine Wachstumshemmzone zeigt die Empfindlichkeit gegen *Lysostaphin* an. Alle getesteten Mikrokokken waren resistent gegen *Lysostaphin*.

SPERBER und TATINI (1975) stellten fest, daß alle 439 koagulasepositiven *Staphylokokken*-Stämme aus Lebensmittelproben *Lysostaphin*-empfindlich waren. 49 *Mikrokokken*-Stämme waren resistent.

Auch GRAMOLI und WILKINSON (1978) haben ihr Untersuchungs-

material aus verschiedenen Quellen mit Hilfe des Lysostaphin-Tests klassifizieren können.

Ebenso unterschieden DEVRIESE (1977,1979) und DEVRIESE und Mitarb. (1978) das Genus Staphylococcus vom Genus Micrococcus mit Hilfe des Lysostaphin-Tests.

GRAZI und Mitarb. (1981) analysierten 1062 Proben aus menschlichem Untersuchungsmaterial auf Selektivmedien für Staphylokokken. Die Lysostaphin-Empfindlichkeit wurde mit Lysostaphin getränkten Papierstreifen auf Agarplatten untersucht. Alle Staphylokokkenstämme konnten gut identifiziert werden.

POUTREL und CAFFIN (1981) erprobten einen Lysostaphin Disk Test, um Staphylokokken in der Routinediagnostik von Mikrokokken unterscheiden zu können. Lyophilisierte Papierblättchen, imprägniert mit 10 µg Lysostaphin, wurden auf Müller-Hinton-Agar gegeben. Der Agar war mit zehn verschiedenen Staphylokokkenspezies und sieben verschiedenen Mikrokokkenspezies beimpft worden. Nach 16 Stunden Inkubation bei 37°C konnte bei allen Staphylokokken eine Wachstumshemmzone festgestellt werden, während alle Mikrokokkenspezies resistent waren.

RAUS und LOVE (1983) klassifizierten ihr tierisches Untersuchungsmaterial nach der Disk Methode von POUTREL und CAFFIN (1983).

MYRICK und ELLNER (1982) und ELLNER und MYRICK (1982) identi-

fizierten Mikrokokken aus humanmedizinischen Quellen mit 50µg/ml Lysostaphin auf Peptonagar.

HOOVER und Mitarb. (1983), GOODFELLOW und Mitarb. (1983), HODGES und Mitarb. (1984), JASPER und Mitarb. (1985) und BALDELLON und MEGRAUD (1985) klassifizierten Staphylokokkenstämme von humaner und tierischer Herkunft sowie von Lebensmitteln mit dem Lysostaphin-Test nach der Methode von SCHLEIFER und KLOOS (1975).

BECKER und Mitarb. (1986) führten den Lysostaphin-Test mit Stämmen von boviner Mastitis nach der Methode von SCHLEIFER und KLOOS (1975) und mit dem Lysostaphin-Test der Fa. ROCHE durch. Bei diesem neuen Test wurde die zu prüfende Kolonie in Pufferlösung suspendiert und zusammen mit einem Lysostaphin-beladenen Papierblättchen in ein Röhrchen gegeben. Nach 2-2,5 Stunden Inkubation bei 37°C kam es bei Lysostaphin-empfindlichen Stämmen zu einer Zelllysis. Die Zellen segmentierten und die Suspension klarte auf. Die beiden Testverfahren entsprachen sich in ihren Ergebnissen.

BINDER (1986) untersuchte Hälftegemelksproben von Ziegen. Der Lysostaphin-Test wurde auf Peptonagar-Platten mit 200 µg/ml Lysostaphinlösung durchgeführt. Alle Stämme der Gattung Staphylococcus zeigten eine Empfindlichkeit gegenüber Lysostaphin und alle Mikrokokken reagierten negativ.

2.4. Furazolidon - Pepton - Agar

Furazolidon ist ein Breitbandchemotherapeutikum aus der Gruppe der Nitrofuranderivate. Furazolidon wirkt bakteriostatisch durch Eingriff in verschiedene Stoffwechselvorgänge der Mikroorganismen innerhalb des Zitratzyklus und der Proteinsynthese. Resistenzentwicklung ist bei Nitrofuranderivaten selten (HAPKE, 1983).

CURRY und BOROVIAN (1976) und SCHLEIFER und KLOOS (1976) erwähnten, daß ein Medium, welches Nitrofuran enthält, das Wachstum von Staphylokokken hemmt, während Mikrokokken ungehindert wachsen. Die zu untersuchenden Kulturen wurden direkt auf den Furazolidon enthaltenden Agar ausgestrichen und vier Tage bei 35 °C inkubiert. Sie benutzten als selektives Furazolidonhaltiges Mikrokokkenmedium den FTO-Agar (Furazolidon- Tween 80- Oil Red-O-Agar).

DEVRIESE und Mitarb. (1978) untersuchten *Staph. hyicus* aus tierischem Untersuchungsmaterial auf Antibiotika-Resistenzen. Alle *Staph. hyicus* Stämme waren empfindlich gegenüber Furazolidon.

DEVRIESE (1979) identifizierte 954 Staphylokokkenstämme aus Kuhmilch. Neun Kulturen waren resistent gegen Furazolidon (Minimale Hemmkonzentration < 4 µg/ml) und wurden als Mikrokokken klassifiziert.

VON RHEINBABEN und HADLOK (1981) konnten 720 Isolate

hauptsächlich von Fleischprodukten auf Furazolidon-Agar gut in die Genera *Staphylococcus* und *Micrococcus* einordnen. Sie benutzten Trypton-Soja-Agar (OXOID CM 131) sowie Pepton-Agar mit Zusatz von 50 µg/ml Furazolidon. Die beimpften Platten wurden zwei Tage bei 35 °C inkubiert. Alle Mikrokokkenstämme zeigten ein gutes Wachstum auf beiden Agarmedien. Das Wachstum der Staphylokokken war gehemmt. Die Autoren empfehlen eine noch geringere Furazolidonkonzentration von 20 bis 30 µg/ml.

DEVRIESE und Mitarb. (1985) benutzten ebenfalls Trypton-Soja-Agar mit 20 µg/ml Furazolidon. Die beimpfte Bouillonkultur wurde auf den Agar gegeben und zwei Tage bei 30 °C inkubiert. 661 koagulasenegative Staphylokokkenstämme von Rind, Schwein, Geflügel, Schaf und Ziege waren alle Furazolidon-empfindlich. BINDER (1986) untersuchte 506 Hälftegemelksproben von Ziegen auf Furazolidon-Pepton-Agar (Pepton-Agar mit Zusatz von 100ml 0,02%ig in Azeton gelöstem Furazolidon). Die Platten wurden durch Ösenausstrich mit einer 24 Stunden bebrüteten Bouillonkultur des Teststammes beimpft und 48 Stunden bei 34 °C bebrütet. Alle Stämme der Gattung *Staphylococcus* zeigten kein Wachstum auf dem Furazolidon-Pepton-Agar. Die Stämme der Gattung *Micrococcus* wuchsen ungestört.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material

Es wurden 371 Stämme untersucht. Die Isolate stammten aus Viertelgemelksproben von euterkranken Kühen aus dem oberbayerischen Raum. Sie wurden vom Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. in Grub zur Verfügung gestellt.

3.2. Methoden

Die Stämme wurden zunächst auf Rinderblutagar- und Diagnostic Sensitivity Test (D.S.T.)- Agarplatten (Oxoid) überimpft und zur Gewinnung von Reinkulturen mehrfach subkultiviert.

Die Blutplatten wurden mit Tryptose Blood Agar Base (Difco Laboratories 0232-01-9) hergestellt.

33 g Tryptose Blood Agar Base und 1 g Äskulin (Art. 848, Merck) werden mit Aqua bidest. auf einen Liter aufgefüllt und anschließend für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Nachdem der Agar auf 50 °C abgekühlt ist, werden 5 % gewaschene Rindererythrozyten zugesetzt und der noch flüssige Nährboden in Petrischalen gegossen.

Der D.S.T. Agar wird hergestellt aus 40 g D.S.T. Agar (Oxoid Code CM 261) mit Zusatz von 0,6 g Äskulin pro Liter. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen erfolgt hier ebenfalls die Zugabe von 5 % gewaschenen Rindererythrozyten.

Die beimpften Platten wurden 18 bis 24 Stunden bei 37 °C bebrütet.

Die gewachsenen Kolonien wurden auf ihre Morphologie, ihre Pigmentbildung und ihre hämolysierenden Eigenschaften untersucht und mit folgenden Untersuchungsmethoden differenziert:

3.2.1. Differenzierung zwischen Micrococcaceae und Streptococcaceae mit Hilfe des Katalase-Tests

Mit einer Platinöse wurde Material von 1 bis 2 Kolonien auf einem trockenen Glasobjektträger mit 1 bis 2 Tropfen Gebrauchsreagenz (Catalase Test, Roche, Art. Nr. 07 3037), das Wasserstoffperoxid und Harnstoff enthält, betropft. Sofort auftretende lebhafte Gasblasenbildung (Sauerstoff) auf dem Kolonienrasen stellte eine positive Reaktion dar. Die Micrococcaceae besitzen im Gegensatz zu Streptokokken das Ferment Katalase, das für die Sauerstofffreisetzung aus Wasserstoffperoxid verantwortlich ist.

3.2.2. Vordifferenzierung von Stämmen der Familie Micrococcaceae

3.2.2.1. Lysostaphin-Test

In einem Röhrchen mit 2 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS Puffer, Roche, Art. Nr. 07 2106 9), pH 7,4, wurde mit der Reinkultur des zu prüfenden katalasepositiven Stammes eine Suspension hergestellt, die dem Mc Farland Trübungsstandard 1 entsprach.

Die Bakteriensuspension wurde auf zwei Röhrchen verteilt und einem davon ein Lysostaphin getränktes Papierblättchen (Lysostaphin Test, Roche, Art. Nr. 07 3035 1) zugegeben. Das zweite Röhrchen diente als Kontrolle. Beide Röhrchen wurden etwa 2 Stunden im Wasserbad oder 2,5 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Als positive Reaktion wurde eine deutliche Abnahme der Trübung im Röhrchen mit dem Lysostaphin Papierdisk gegenüber dem Kontrollröhrchen gewertet. Nur Staphylokokkenzellen werden durch Lysostaphin aufgelöst, sedimentieren und die Suspension klart auf. Mikrokokken sind gegen die Enzyme resistent, die Trübung bleibt bestehen (SCHLEIFER, 1981 und SCHLEIFER und KLOOS, 1975).

3.2.2.2. Furazolidon- Pepton- Agar

Furazolidon-Pepton- Agarplatten wurden durch Ösenausstrich mit einer 24 Stunden bebrüteten Bouillonkultur beimpft und 48 Stunden bei 35 °C inkubiert.

Der Peptonagar mit einem pH-Wert von 7,0 enthält pro Liter destilliertes Wasser folgende Zusätze:

Pepton	10 g	(Merck Art. 7216)
Hefeextrakt	5 g	(Merck Art. 3753)
Kochsalz	5 g	(Merck Art. 6404)
Glukose	1 g	(Merck Art. 8342)
Agar	12 g	(Merck Art. 1614)

Der Agar wurde für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert und auf 48 °C abgekühlt. Dann wurden 100 ml 0,02 bis 0,03 % in Aceton (Merck Art. 14) gelöstes Furazolidon (Furazolidon, Sigma, Art. F 9505) zugegeben und gemischt.

Das Breitbandchemotherapeutikum Furazolidon hemmt das Wachstum von Staphylokokken, während Mikrokokken ungehemmt wachsen (SCHINDLER, 1966; SCHLEIFER, 1981; VON RHEINBABEN und HADLOK, 1981; CURRY und BOROVIAN, 1976).

3.2.3. Speziesdifferenzierung der Gattung *Staphylococcus*

3.2.3.1. Plasmakoagulase

Der Koagulasenachweis wurde mit lyophilisiertem Kaninchenplasma der Firma bioMerieux Best. Nr. 55181 oder 55182 durchgeführt.

Alle Stämme wurden in einer peptonhaltigen Nährbouillon (Standard 2 Bouillon, Diagnostica Merck, Art.Nr.7884) 18 bis 24 Stunden bei 37°C bebrütet.

Darauf wurden 0,5 ml der Kaninchenplasmaverdünnung mit 0,5 ml der zu untersuchenden Bouillonkultur in ein Rundbodenröhrchen (70mm hoch, 10 mm Durchmesser) gegeben, geschüttelt und in ein Wasserbad mit 37°C gestellt. Ein zweiter Ansatz mit 0,3 ml Kaninchenplasma und 0,1 ml der angesetzten Kultur erwies sich als ebenso brauchbar und wurde später alleine weitergeführt. *Staph. aureus* bildet Plasmakoagulase, ein Ferment, welches in Gegenwart eines Plasmafaktors (Coagulase Reacting Factor) Fibrinogen in Fibrin umwandelt und auf diese Weise Blutplasma zum Gerinnen bringt.

Die Gerinnung tritt gewöhnlich innerhalb der ersten 3 Stunden auf. Meist wird das gesamte Plasma fest und das Koagulum haftet an der Röhrchenwand (dies entspricht einer 4 + Reaktion). Es wurden 3 + und 4 + Reaktionen als positiv gewertet. Eine 3 + Reaktion zeigt sich als festes Koagulum, das

jedoch nicht an der Röhrchenwand klebt und von klarem Plasma umgeben ist. Die Reaktion kann als positiv angesehen werden, wenn die Gerinnung innerhalb von 24 Stunden auftritt. Das Ablesen fand nach 1, 2, 3 und 24 Stunden statt.

3.2.3.2. Clumping factor

3.2.3.2.1. Clumping factor Objektträgertest

Dieser Test wurde mit den 330 Staphylokokkenstämmen durchgeführt. Der Clumping factor ist auf der Zellwand von *Staphylococcus aureus* lokalisiert und reagiert direkt mit Fibrinogen (DUTHIE, 1954).

20 µl Kaninchenplasma (Fa. bioMerieux) wurden auf einem gereinigten Glasobjektträger mit 1 bis 2 Kolonien der zu untersuchenden Kultur gemischt. Eine positive Reaktion war innerhalb einiger Minuten an einer deutlichen Flockenbildung zu erkennen. Die Staphylokokkenzellen verklumpten. Im negativen Fall entstand ein milchig homogenes Gemisch.

3.2.3.2.2. Staphyslide Test

Der CF wurde bei den 330 Staphylokokkenstämmen auch mit dem Staphyslide Test untersucht.

Ein Tropfen sensibilisierte Schaferythrozytensuspension (Sta-

physlide Test, bioMerieux, Best. Nr. 55081) wurde mit 1 bis 2 Kolonien der Kultur auf einem Glasobjektträger vermischt und dieser leicht rotierend bewegt.

Innerhalb von 15 Sekunden war eine deutliche Verklumpung zu beobachten. Als Kontrolle diente ein Tropfen nicht sensibilisierter Erythrozyten.

Bei diesem Test handelt es sich um einen indirekten Hämagglutinationstest. Die durch Fibrinogen sensibilisierten Hammelerythrozyten werden in Gegenwart eines Staph. aureus- Stammes agglutiniert.

3.2.3.3. Hämolysine

Die Hämolysineigenschaften der untersuchten Stämme wurden nach 24 stündiger Bebrütung der beimpften Blut- und D.S.T.-Agarplatten beurteilt.

Laut GEDEK (1972) unterscheidet man α -, β - und γ -Hämolysin. Das α -Hämolysin wirkt auf Erythrozyten von Kaninchen, Rind, Schaf und Ziege. Es ruft auf Blutagarplatten eine weite vollständige Lysiszone mit unscharfem Rand hervor. Das β -Hämolysin bewirkt eine Partialhämolyse von Rinder-, Schaf- und Ziegenerythrozyten. Auf Blutagarplatten zeigt sich eine bräunlich verfärbte Zone mit einem unscharfen Rand, die sich vom unveränderten Nährboden und einer angrenzenden α -Hämolysezone absetzt.

Auf Grund der ähnlichen Einwirkung von α - und δ -Hämolysin auf Rinderblutagar wurden alle vollständigen Hämolyse als α -Hämolysininwirkung aufgeführt.

3.2.3.4. Pigmentbildung

Die Pigmentproduktion wurde nach 24 stündiger Bebrütung auf Rinderblut- und D.S.T.-Agarplatten beobachtet.

Nach GEDEK (1972) ist die Pigmentbildung abhängig von der Zusammensetzung der Atmosphäre und des Nährbodens, sowie von der Temperatur und dem Lichtzutritt.

Es erwiesen sich nur zwei Pigmenttypen als klar voneinander unterscheidbar, nämlich weiß ohne jede Gelbfärbung und gelb in verschiedener Intensität. Weiß ohne Gelbfärbung wurde als unpigmentiert eingestuft.

3.3. Untersuchungsergebnisse

3.3.1. Identifizierung der Micrococcaceae mit dem Katalase-Test

Alle 371 getesteten Stämme zeigten eine positive Katalase-Reaktion. Es befanden sich nur Mitglieder der Familie Micrococcaceae im Untersuchungsmaterial.

3.3.2. Vordifferenzierung von Stämmen der Familie Micrococcaceae

3.3.2.1. Lysostaphin-Test

Im Lysostaphin-Test zeigten 338 Stämme eine positive Reaktion und mußten somit als Staphylokokken gewertet werden. Die Lysis der Staphylokokkenzellen führte zu einer deutlichen Abnahme der Trübung im Röhrchen.

30 Stämme erbrachten ein negatives Testergebnis. Drei Stämme waren nicht zu interpretieren, weil im Ansatz keine ausreichende Trübung hergestellt werden konnte und somit eine eventuelle Abnahme der Trübung nicht zu beurteilen war.

3.3.2.2. Furazolidon- Pepton- Agar

Furazolidon konnte das Wachstum von 350 Staphylokokkenstämmen hemmen. 19 Stämme zeigten ein ungestörtes Wachstum. Ein sehr schwaches Wachstum bei zwei Stämmen konnte nicht eingeordnet werden.

Auch nach mehrmaliger Wiederholung der Untersuchungen zeigten die Ergebnisse des Lysostaphin-Tests im Vergleich zur Auswertung des Furazolidon- Pepton- Agars bei insgesamt 28 Stämmen keine Übereinstimmung oder waren nicht auswertbar. 330 Stämme wurden in beiden Tests übereinstimmend als Staphylokokken und 13 Stämme als Mikrokokken identifiziert.

3.3.3. Speziesdifferenzierung der Gattung Staphylococcus

In die folgenden Untersuchungen wurden nur die 330 Stämme, die zweifelsfrei als Angehörige der Gattung Staphylococcus identifiziert worden waren, einbezogen.

3.3.3.1. Plasmakoagulase

Insgesamt waren 263 Stämme koagulasepositiv, davon 212 Stämme (80,6%) bereits nach 3 Stunden. 67 Isolate zeigten eine negative Koagulasereaktion.

Tab. 1: Ergebnisse der Plasmakoagulasereaktion

Ablesung nach	1	2	3	24	Stunden
Anzahl koagulase-positiver Stämme	43	87	82	51	
Summe koagulase-positiver Stämme	43	130	212	263	

3.3.3.2. Clumping factor

3.3.3.2.1. Clumping factor Objektträgertest

Staphylokokken mit Clumping factor (CF) zeigen eine deutliche Verklumpung auf dem Objektträger. Im negativen Fall entsteht eine milchig homogene Emulsion.

Insgesamt reagierten im CF Objektträgertest 206 Stämme positiv und 116 Stämme negativ.

Bei acht Stämmen konnte das Ergebnis wegen nur geringer Flockenbildung nicht eindeutig beurteilt werden.

3.3.3.2.2. Staphyslide Test

Der CF wurde auch mit dem Staphyslide Test untersucht.

Die Ergebnisse konnten gut mit der Kontrolle verglichen werden. Es traten nur eindeutige Ergebnisse auf.

Im Staphyslide Test reagierten 206 Stämme positiv. Bei 124 Stämmen war kein CF nachzuweisen.

Tab. 2: Ergebnisse der Untersuchungen auf Clumping Factor
mit dem Objektträgertest und dem Staphyslide Test

	Clumping factor Reaktion		
	CF +	CF -	CF ?
Objektträgertest	206	116	8
Staphyslide Test	206	124	0

3.3.3.3. Hämolyse

Die Hämolyisinbildung wurde auf Rinderblutplatten und auf D.S.T.- Agarplatten beurteilt.

Es ergab sich entweder eine kombinierte α - und β -Hämolyse oder in einigen Fällen nur eine β -Hämolyisinbildung.

Als schwach wurde die Hämolyse bezeichnet, wenn sie dieselbe Ausdehnung auf der Agarplatte hatte wie die Bakterienkolonie. Diese schwache Hämolyse wird in den folgenden Aufstellungen in Klammern aufgeführt.

Eine starke Hämolyse dehnte sich über eine zwei- bis dreimal so große Fläche auf der Agarplatte aus wie die gewachsene Kolonie (FINK, 1961).

Tab. 3: Ergebnisse der Untersuchung der Hämolyisinbildung der 330 Staphylokokkenstämme

Art der Hämolyse	α, β	(α, β)	negativ
Anzahl der Stämme	238	53	39

3.3.3.4. Pigmentbildung

Die Pigmentbildung wurde eingeteilt in hellgelb und golden. Weiß oder grauweiß galten als negative Pigmentbildung.

Tab. 4: Ergebnisse der Untersuchung auf Pigmentbildung der
330 Staphylokokkenstämme

Pigment	hellgelb	golden	negativ
Anzahl der Stämme	125	98	107

Insgesamt bildeten 223 Stämme Pigment, 107 waren unpigmentiert.

Die Pigmentbildung war auf D.S.T.-Agar deutlicher zu erkennen als auf Rinderblutplatten.

4. Diskussion

In dieser Arbeit sollte ein indirekter Hämagglutinationstest zum Nachweis des Clumping factor von *Staph. aureus* - Stämmen geprüft werden. Ferner sollte geklärt werden, ob ein solcher Test in der Routinediagnostik zum Nachweis von *Staph. aureus* aus bovinen Milchproben den Plasmakoagulasetest ersetzen kann.

Der Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. in Grub stellte Viertelgemelksproben von mastitiskranken Rindern zur Verfügung, aus denen 371 *Micrococcaceae*-Isolate gewonnen wurden.

Die Isolate wurden zur Gewinnung von Reinkulturen mehrfach auf Rinderblut- und Diagnostic Sensitivity Test-Agarplatten subkultiviert.

Alle Isolate wurden mit dem Katalase-Test als *Micrococcaceae* identifiziert.

Zur Unterscheidung der Genera *Staphylococcus* und *Micrococcus* wurde der Lysostaphin Papierdisk-Test der Fa. Roche sowie eine Beimpfung auf Furazolidon-Pepton-Agar durchgeführt.

Das Enzym Lysostaphin greift nur Staphylokokken an und löst deren Zellen auf, während Mikrokokkenzellen resistent sind (PULVERER, 1968a). Furazolidon, ein Breitbandchemotherapeutikum aus der Gruppe der Nitrofuranderivate, gelöst in Pepton-Agar, hemmt das Wachstum von Staphylokokken. Mikrokokken wachsen dagegen ungehindert auf diesem Nährboden (CURRY und BOROVIAN, 1976; SCHLEIFER und KLOOS, 1976).

Alle 371 Micrococcaceae-Stämme wurden im Lysostaphin-Test und auf dem Furazolidon-Pepton-Agar untersucht.

Tab.5: Ergebnisse im Lysostaphin-Test und auf dem Furazolidon-Pepton (FP)-Agar

	Lysostaphin-Test		
	+	-	?
FP-Agar			
Wachstum	6	13	-
kein Wachstum	330	17	3
fraglich	2	-	-

330 Stämme waren im Lysostaphin-Test positiv und zeigten kein Wachstum auf dem FP-Agar. Diese Stämme wurden auf Grund des übereinstimmenden Ergebnisses in beiden Tests als Staphylokokken identifiziert. 13 Stämme wurden ebenfalls übereinstimmend als Mikrokokken identifiziert. Sie reagierten negativ im Lysostaphin-Test und wuchsen ungehemmt auf FP-Agar. 17 Stämme waren sowohl im Lysostaphin-Test als auch auf dem FP-Agar negativ und sechs Stämme reagierten in beiden Tests positiv. Es ergaben sich also insgesamt bei 23 Stämmen widersprüchliche Resultate in den beiden Tests.

Der Lysostaphin-Test konnte bei drei Stämmen nicht eindeutig beurteilt werden, weil bereits im Ansatz keine ausreichende Trübung erreicht werden konnte. Diese drei Stämme zeigten auf FP-Agar kein Wachstum. Zwei Stämme zeigten auf FP-Agar ein sehr geringes Wachstum und konnten deshalb nicht eindeutig beurteilt werden. Insgesamt waren 28 Stämme nicht eindeutig durch die beiden Tests in die Genera *Staphylococcus* und *Micrococcus* einzuordnen. Die Ergebnisse beider Tests stimmten in 92,5% der Fälle überein.

PULVERER (1968a, 1968b), SPERBER und TATINI (1975), LACHICA und Mitarb. (1971), GRAZI und Mitarb. (1981) sowie POUTREL und CAFFIN (1981) setzten den Lysostaphin-Test mit bis zu 100%iger Sicherheit zur Klassifizierung der Genera *Staphylococcus* und *Micrococcus* verschiedener Herkunft ein. Alle Autoren empfehlen den Lysostaphin-Test zur Klassifizierung der *Micrococcaceae*.

In ihrer Arbeit zur Differenzierung der Genera *Staphylococcus* und *Micrococcus* mit verschiedenen Untersuchungsmethoden empfehlen SCHLEIFER und KLOOS (1976) den Lysostaphin-Test als gute und schnelle Differenzierungsmethode. Auch der FP-Agar wird positiv beurteilt.

Zur Durchführung des Lysostaphin-Tests wurde in den eigenen Untersuchungen Koloniematerial in 2 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung bis zur Trübung der Emulsion aufgeschwemmt. Von diesem Ansatz wurde 1ml als Kontrolle verwendet, während

1ml mit einer Lysostaphin getränkten und dann getrockneten Papierscheibe versehen und zusammen mit der Kontrolle 2 Std. bei 37°C inkubiert wurde. Bei Vorliegen von Staphylokokken war nach der Inkubation die Trübung verschwunden, die Bakterienzellen waren durch das Lysostaphin aufgelöst. Bei Mikrokokken blieb die Trübung bestehen, da diese von Lysostaphin nicht aufgelöst werden. Die Auswertung der Ergebnisse war in fast allen Fällen eindeutig möglich. Nicht ablesbare Resultate traten bei weniger als einem Prozent der Proben auf. Bei diesen Proben war entweder zu wenig Material vorhanden, um eine deutliche Trübung der Emulsion zu erreichen oder das Kulturmateriel war auf Grund seiner Konsistenz sehr schlecht zu emulgieren.

BINDER (1986) ordnete 100% der untersuchten Micrococcaceae-Stämme mit dem Lysostaphin-Test und dem FP-Agar ein. VON RHEINBABEN und HADLOK (1981) konnten 97,9% der von ihnen untersuchten Micrococcaceae-Stämme mit dem FP-Agar klassifizieren.

In den eigenen Untersuchungen wurde 0,02 bis 0,03% in Aceton gelöstes Furazolidon dem Peptonagar zugegeben. Die beimpften Platten wurden 48 Stunden bei 35°C inkubiert. Die eindeutige Ablesung der Ergebnisse war auch ohne Übung möglich. Allerdings stellt die notwendige Bebrütungsdauer von 48 Stunden einen gewissen Nachteil dar. Insgesamt lieferten der Lysostaphin-Test und der FP-Agar gute Ergebnisse bei der

Differenzierung der Genera *Staphylococcus* und *Micrococcus*.

Die folgenden Untersuchungen wurden nur mit den 330 eindeutig bestimmten Staphylokokkenstämmen durchgeführt.

Die Speziesdifferenzierung dieser Staphylokokkenstämmen wurde mit dem Plasmakoagulasetest durchgeführt. Die Plasmakoagulase oder freie Koagulase (DUTHIE, 1954, 1955) wird von koagulase-positiven Staphylokokken gebildet und in das umgebende Medium abgegeben. Zusammen mit Prothrombin bildet sie ein Thrombin-ähnliches Koagulum.

Die Koagulasereaktion wurde im Röhrchenverfahren mit Kaninchenplasma der Fa. bioMérieux durchgeführt. Die Koagulumbildung wurde nach 1, 2, 3 und nach 24 Stunden Bebrütung beurteilt. Insgesamt erwiesen sich 263 Stämme als koagulase-positiv. Davon war bei 212 positiven Stämmen (80,6%) bereits nach 3 Std. eine Reaktion zu erkennen. Bei den restlichen 51 koagulasepositiven Stämmen konnte eine Koagulumbildung erst nach 24 Std. Inkubation registriert werden. Es ist zu empfehlen, die Ergebnisse der Plasmakoagulasereaktion in mehreren Intervallen während 24 Std. zu beurteilen. In den eigenen Untersuchungen wurde jedoch die Auflösung eines bereits vorhandenen Koagulums durch Protease (SPERBER und TATINI, 1975) oder Staphylokinase (KITZROW und BLOBEL, 1981) nicht beobachtet. 67 Isolate zeigten in der Plasmakoagulase-reaktion ein negatives Ergebnis.

Früher wurde der Plasmakoagulasetest als Referenzmethode zur

Identifizierung von *Staph. aureus* empfohlen (ANON, 1965) und findet auch heute noch v.a. in der Humanmedizin zur Identifizierung von *Staph. aureus* Anwendung. Da jedoch aus Untersuchungsmaterial von Tieren neben *Staph. aureus* noch andere koagulasepositive Staphylokokken, wie *Staph. hyicus* und *Staph. intermedius*, isoliert wurden (KLOOS und SCHLEIFER, 1981), müssen weitere Differenzierungsmerkmale, etwa der Clumping factor, zur Identifizierung von *Staph. aureus* herangezogen werden.

DUTHIE (1955) stellte fest, daß die Plasmakoagulase und der Clumping factor (CF) zwei völlig verschiedene Prinzipien sind. Bei *Staph. aureus*-Stämmen sind beide Faktoren vorhanden (CADNESS- GRAVES, 1943; HEESCHEN und Mitarb., 1970; KROIHER, 1967; MORTON und COHN, 1972; DEVRIESE, 1976; KROEMER und Mitarb., 1977; DEVRIESE und HAJEK, 1980; BRÜCKLER und Mitarb., 1981b; BIBERSTEIN und Mitarb., 1984). In der Untersuchung von DEVRIESE und Mitarb. (1985) waren alle koagulasenegativen Staphylokokkenstämme von verschiedenen Tierarten, darunter auch Isolate von bovinen Milchproben, CF-negativ.

In den eigenen Untersuchungen wurde der CF-Test auf dem Objektträger mit Kaninchenplasma der Fa. bioMerieux und mit dem Staphyslide Test der Fa. bioMerieux durchgeführt. Der CF (gebundene Koagulase) findet sich an der Oberfläche von koagulasepositiven Staphylokokken.

Im Objektträger-Test wirkt der CF von Staph. aureus direkt auf das Fibrinogen des Kaninchenplasmas und es kommt zur Verklumpung der Staphylokokken (DUTHIE, 1954). Der Staphyslide Test dagegen ist ein indirekter Hämagglutinationstest (FLANDROIS und CARRET, 1981). In Gegenwart eines Staph. aureus-Stammes werden durch Fibrinogen sensibilisierte Hammelerythrozyten agglutiniert.

In den beiden Tests zum Nachweis des Clumping factor erbrachten die untersuchten 330 Staphylokokkenstämme folgende Ergebnisse:

Tab. 6: Ergebnisse des CF-Tests auf dem Objektträger und des Staphyslide-Tests

	Staphyslide-Test			Objektträger-Test		
	+	-	?	+	-	?
koagulase-positive	198	65	0	196	64	3
koagulase-negative	8	59	0	10	52	5
Staphylokokken						

Die koagulasepositiven Staphylokokken waren im Objektträger-Test zu 74,5% (196 Stämme) CF-positiv. Im Staphyslide Test reagierten 75,2% (198 Stämme) CF-positiv. Im Objektträger-Test reagierten 24,3% (64 Stämme) und im Staphyslide Test 24,7% (65 Stämme) der koagulasepositiven Stämme CF-negativ. Von den koagulasenegativen Stämmen waren 77,6% (52 Stämme) im Objektträger-Test und 88,1% (59 Stämme) im Staphyslide Test CF-negativ. Falsch positive Ergebnisse der koagulase-negativen Stämme ergaben sich bei 14,9% (10 Stämme) im Objektträger - Test und bei 11,9% (8 Stämme) im Staphyslide Test. Insgesamt konnten acht Stämme im Objektträger -Test wegen zu geringer Flockenbildung nicht bewertet werden. Im Staphyslide Test wurden nur eindeutige Ergebnisse erzielt. Bei zwei Stämmen stimmten die Ergebnisse in beiden Tests nicht überein. Insgesamt waren also mit dem Staphyslide Test etwas bessere Resultate zu erzielen als mit dem Objektträger Test.

FLANDROIS und CARRET (1981) ziehen den indirekten Hämagglutinationstest dem Objektträgertest vor. Sie erzielten mit dem indirekten Hämagglutinationstest bessere Ergebnisse. Die folgenden Autoren empfehlen den indirekten Hämagglutinationstest für die Routinediagnostik von *Staph. aureus*. Der Koagulasetest kann nach Meinung dieser Autoren durch den indirekten Hämagglutinationstest ersetzt werden. Vor allem seine einfache Durchführung macht ihn für die Routine-

diagnostik wertvoll.

CARRET und Mitarb. (1982) konnten mit dem indirekten Hämagglutinationstest 98,8% der Staph. aureus-Stämme aus humanmedizinischem Material identifizieren. Dieser Test war besser als der Röhrchenkoagulasetest, weil er standardisiert werden konnte und präzisere Ergebnisse erbrachte.

PENNELL und Mitarb. (1984) verglichen u.a. einen Hämagglutinationstest (Staphyloslide, BBL Microbiology Systems) mit dem Koagulasetest. Der Staphyloslide Test identifizierte 98,8% der Staph. aureus-Stämme. BOUWMAN und VINCENTIE (1984) konnten 92,9% der koagulasepositiven Staphylokokkenstämme von Lebensmittelproben mit dem Staphyslide Test identifizieren. URBANCZIK (1984) differenzierte alle untersuchten Staph. aureus-Stämme aus humanmedizinischem Untersuchungsmaterial mit dem Staphyloslide Test. ALDRIDGE und Mitarb. (1984) identifizierten ebenfalls alle Staph. aureus-Stämme mit dem Staphyloslide Test. Sie erhielten bei zwei koagulasenegativen Staphylokokkenstämmen falsch positive Ergebnisse. BAKER und Mitarb. (1985) konnten 100% ihrer Staph. aureus Isolate mit dem Staphyloslide Test differenzieren. Der Röhrchenkoagulasetest erbrachte 92,5% und der Objektträger-Test nur 87,9% richtige Ergebnisse. Auch BERKE und TILTON (1986) empfehlen den indirekten Hämagglutinationstest, um Staph. aureus zu identifizieren. Der Staphyloslide Test erbrachte 98,3% richtige Ergebnisse, während der konventionelle Objektträger-

Test bei 97,5% und der Röhrchenkoagulasetest bei 99,2% lagen.

In der vorliegenden Arbeit stimmten die beiden CF-Tests zu 99,4% in ihren Ergebnissen überein. Zur Identifizierung von *Staph. aureus* ist der indirekte Hämagglutinationstest als zuverlässige und einfache Methode für die Routinediagnostik zu bewerten. Er ist in der Handhabung, der Zuverlässigkeit und in der Bewertung dem konventionellen Objektträger-Test überlegen. Die in Tropffläschchen abgefüllten sensibilisierten Hammelerythrozyten enthalten im Gegensatz zu Plasma keine Produkte, die mit den Staphylokokken reagieren könnten. Auch die Flüssigkeitsmengen sind standardisiert (FLANDROIS und CARRET, 1981).

Die Pigmentproduktion der untersuchten Staphylokokkenstämme wurde auf Rinderblutplatten und auf D.S.T.-Agarplatten beobachtet. Weiß wurde als pigmentlos bewertet (MOSSEL, 1962). Vorhandene Pigmentierung wurde eingeteilt in goldfarben und hellgelb (REID und WILSON, 1959; GEDEK, 1972). In der vorliegenden Untersuchung waren insgesamt 76,4% der koagulasepositiven Staphylokokkenstämme Pigmentbildner, 33,1% dieser Stämme bildeten goldgelbes Pigment. Von den koagulase-negativen Staphylokokkenstämmen bildeten nur 29,8% Pigment, davon 11,9% goldfarbenes. Die Pigmentbildung war auf D.S.T.-Agar gut zu beurteilen und war auch nach längerer Aufbewahrung ein konstantes Merkmal der Kulturen. Auf den

Rinderblutplatten zeigten die gewachsenen Kulturen nach kurzer Zeit Veränderungen ihrer Pigmentierung (DEVRIESE und HAJEK, 1980; GEDEK; 1972).

Tab.7: Ergebnisse der Pigmentproduktion, unterschieden nach koagulasepositiven und -negativen Staphylokokken

	goldfarben	hellgelb	weiß
263 koagulase-positive	87 (33,1%)	114 (43,3%)	62 (23,6%)
67 koagulase-negative Staphylokokken	8 (11,9%)	12 (17,9%)	47 (70,1%)

Die Pigmentbildung ist äußeren Faktoren wie der Art des Nährbodens, dem Einfluß des Lichtes und der Temperatur unterworfen. GEDEK (1972) testete verschiedene Nährmedien und konnte die Pigmente am besten auf Glycerinmonoacetataragar bestimmen. Der D.S.T.-Agar war in dieser Untersuchung bei standardisierten Bedingungen dem Rinderblutagar überlegen. In der vorhandenen Literatur gehen die Meinungen darüber, ob man die Pigmentbildung der Staphylokokken als Patho-

genitätsmerkmal heranziehen kann, auseinander. Zwar zeigt der Großteil der koagulasepositiven Staphylokokkenstämme gelbes oder orangefarbenes Pigment, aber auch bis zu 50% der koagulasenegativen Stämme sind Pigmentbildner (REID und WILSON, 1959; MESSER, 1961; MOSSEL, 1962). URBANCZIK (1984) konnte nur bei 50% seiner Staph. aureus-Stämme aus humanmedizinischem Material eine Pigmentierung beobachten. Bei ESSERS und RADEBOLD (1980b) sowie BECKER und Mitarb. (1986) war ein Viertel der Staph. aureus-Stämme pigmentlos. Diese Autoren sprechen sich gegen die Beurteilung der Pigmentproduktion zur Pathogenitätsbestimmung aus. Eine andere Meinung vertreten ABO ELNAGA und KANDLER (1965a), die die völlige Pigmentlosigkeit für ein typisches Merkmal apathogener Stämme halten. Die gleiche Meinung vertreten HEESCHEN und Mitarb. (1970), KLOOS und Mitarb. (1974, 1976a, 1976b), DEVRIESE und HAJEK (1980) sowie RAUS und LOVE (1983).

Auf Grund der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen erscheint es wertvoll, eine positive Pigmentproduktion zusätzlich als Differenzierungsmerkmal für Staph. aureus heranzuziehen. Die Pigmentproduktion allein zur Diagnostik von Staph. aureus genügt nicht, da auch Staphylokokken anderer Spezies Pigment bilden.

Die hämolysierenden Eigenschaften der 330 Staphylokokkenstämme wurden auf Rinderblutagar und auf D.S.T.-Agar

beurteilt.

Bei allen hämolysinbildenden Stämmen war das β -Hämolysin kombiniert mit einer α -Hämolysinzone. Als schwach wurde die Hämolysen bezeichnet, wenn sie auf der Agarplatte denselben Ausbreitungsgrad wie die Bakterienkolonien hatte. Diese schwache Hämolysen wird in der folgenden Tabelle 8 in Klammern aufgeführt. Eine als stark eingestufte Hämolysen bedeckte eine zwei- bis dreimal so große Agarfläche wie die gewachsenen Kolonien.

Tab. 8: Ergebnisse der Hämolysinproduktion der Staphylokokken

	koagulasepositive	koagulasenegative
Hämolysen		
α, β	230 (87,5%)	8 (11,9%)
(α, β)	26 (9,9%)	27 (40,3%)
negativ	7 (2,7%)	32 (47,8%)

87,5% der koagulasepositiven Stämme zeigten eine starke α, β -Hämolysinbildung. 9,9% waren schwache (α, β)-Hämolysinbildner und nur 2,7% der koagulasepositiven Stämme produzierten keine Hämolysine. Die koagulasenegativen Stämme waren zu 47,8% Hämolysin negativ. 40,3% zeigten eine schwache (α, β)-Hämolysinproduktion und 11,9% waren Hämolysin positiv. Er-

wartungsgemäß machten die β -Hämolysinbildner den größten Anteil unter den koagulasepositiven Stämmen aus. Die β -Hämolysinproduktion ist eine typische Eigenschaft boviner Staph. aureus-Stämme (ELEK und LEVY, 1950; REID und WILSON, 1959; MUNCH-PETERSEN, 1960; MUNCH-PETERSEN und GARDINER, 1965; MESSER, 1961; ABO ELNAGA und KANDLER, 1965a; DEVRIESE, 1979, 1984; DEVRIESE und HAJEK, 1980; OBIGER, 1960; BECKER und Mitarb., 1986).

SCHALM und WOODS (1959) beobachteten ebenfalls die kombinierte α, β -Hämolyse bei ihren Staph. aureus-Stämmen aus Milchproben. GEDEK (1972) erhielt bei 86,7% der bovinen Staph. aureus-Stämme α, β und δ -Hämolyse kombiniert. HEESCHEN und Mitarb. (1970) konnten bei 94,5% der Staph. aureus-Stämme aus Milchproben das β -Hämolysin nachweisen. Davon waren 66,9% kombiniert mit dem α -Hämolysin.

DEVRIESE und HOMMEZ (1975), DEVRIESE und OEDING (1976) sowie HAJEK und MARSALEK (1976) erhielten zu 100% das β -Hämolysin bei Staph. aureus aus Mastitismilch. JASPER und Mitarb. (1985) untersuchten Staph. aureus aus Milchproben und erhielten bei 99% der Stämme eine α - oder α, β -Hämolysinbildung. Die Autoren halten die Beobachtung der Hämolysinproduktion von Staph. aureus aus Milch für die Diagnostik für gut geeignet. Zur Identifizierung von Staph. aureus aus Milchproben sollte man in der Routinediagnostik die β -Hämolysinproduktion wie auch

die Pigmentbildung berücksichtigen (ABO ELNAGA und KANDLER, 1965a; DEVRIESE und HAJEK, 1980; DEVRIESE, 1979).

Tab.9: Die Hämolysinproduktion der koagulasepositiven Staphylokokken in Kombination mit dem Ergebnis des CF-Tests (Staphyslide)

	koagulasepositiv mit CF	koagulasepositiv ohne CF
Hämolysine		
α, β	185 (93,4%)	62 (95,4%)
(α, β)	8 (4,0%)	2 (3,1%)
negativ	5 (2,5%)	1 (1,5%)

Die koagulasepositiven Staphylokokken mit CF waren in dieser Untersuchung zu 93,4% starke α, β -Hämolysinbildner. 4,0% der koagulasepositiven, CF positiven Staphylokokken bildeten eine schwache (α, β)-Hämolyse aus. Nur 2,5% dieser Stämme zeigten überhaupt keine Hämolyse.

95,4% der koagulasepositiven, jedoch CF negativen Staphylokokken fielen durch eine starke α, β -Hämolyse auf. 3,1% dieser Stämme bildeten eine schwache (α, β)-Hämolyse und 1,5% keine Hämolysezone.

Der hohe Prozentsatz der stark hämolysierenden Stämme unter den koagulasepositiven, CF negativen legt eine Berücksichtigung der Hämolysen als zusätzliches Differenzierungsmerkmal zum Staphyslide Test nahe, um im Staphyslide Test CF negative Staph. aureus- Stämme zu erfassen. Der Wert dieses Merkmals bei CF negativen Stämmen zur Identifizierung von Staph. aureus wird untermauert durch die Tatsache, daß nur 11,9% der koagulasenegativen Staphylokokken starke α, β -Hämolysinbildner sind (siehe Tab. 8).

Pigmentbildung war bei 76,4% der koagulasepositiven Staphylokokken vorhanden, während nur 29,8% der koagulasenegativen Stämme Pigment bildeten (Tab. 9).

Tab. 10: Pigmentbildung bei koagulasepositiven, CF positiven (Staphyslide) Staphylokokken und deren Hämolysinproduktion

	Pigmentbildung	
	+	-
Hämolysen		
α, β	135 (68,2%)	50 (25,3%)
(α, β)	5 (2,5%)	3 (1,5%)
neg.	3 (1,5%)	2 (1,0%)

Von den 185 stark α, β -Hämolysin bildenden Stämmen waren 135 (73%) pigmentiert. Fünf der acht schwach hämolysinbildenden Stämme und drei der fünf nicht hämolysierenden Stämme zeigten Pigmentbildung.

Insgesamt wiesen 140 der 198 koagulasepositiven Stämme (70,7%) die drei Eigenschaften CF (Staphyslide), Hämolysen und Pigmentbildung gemeinsam auf.

Tab. 11: Pigmentbildung bei koagulasepositiven, CF negativen (Staphyslide) Staphylokokken und deren Hämolysinproduktion

	Pigmentbildung	
	positiv	negativ
Hämolysen		
α, β	62	0
(α, β)	0	2
neg.	0	1

Von den 65 koagulasepositiven, CF negativen Staphylokokkenstämmen besaßen 62 (95,4%) die Eigenschaften Pigmentbildung und starke α, β -Hämolysinbildung. Nur insgesamt drei (4,6%) der Stämme waren nicht pigmentiert, einer davon bildete kein Hämolysin.

Tab. 12: Hämolysinproduktion, Pigmentbildung und Verhalten im CF-Test (Staphyslide) der 263 koagulasepositiven Staphylokokkenstämme

	Anzahl der koagulasepositiven Staphylokokkenstämme
CF+, Hämolyse und Pigmentbildung pos.	140 (53,2%)
CF+ und Hämolyse, Pigmentbildung neg.	53 (20,1%)
CF+ und Pigmentbildung, Hämolyse neg.	3 (1,1%)
CF+, Hämolyse neg., Pigment neg.	2 (0,8%)
CF-, Hämolyse und Pigmentbildung	62 (23,6%)
CF-, Hämolyse neg., Pigmentbildung	0
CF-, Pigmentbildung neg., Hämolyse	2 (0,8%)
CF-, Hämolyse neg., Pigmentbildung neg.	1 (0,4%)

Im Staphyslide Test positiv, hämolysierend und pigmentbildend waren 53,2% der 263 koagulasepositiven Staphylokokkenstämme. CF+ und hämolysierend reagierten 20,1%. CF+ und gleichzeitig Pigmentbildner waren 1,1%. Im Staphyslide negativ, jedoch hämolysierend und pigmentbildend waren 23,6% der koagulasepositiven Stämme.

Wenn man ein positives Ergebnis in zwei der drei Tests, nämlich Staphyslide, Pigmentbildung und β -Hämolysinproduktion, als ausreichend für die Identifizierung von Staph. aureus

gelten läßt, so sind insgesamt 98,0% der koagulasepositiven Staphylokokken dieser Untersuchungen in diese Spezies einzuordnen.

Ein Stamm war CF negativ, Hämolysin negativ und nicht pigmentiert. Zwei weitere CF negative Stämme waren nicht pigmentiert, zeigten aber eine schwache (α, β)-Hämolyse. Zwei CF positive Stämme zeigten keine Hämolyse und bildeten kein Pigment. Diese fünf Stämme wurden nicht als *Staph. aureus* gewertet.

Die ebenfalls koagulasepositive Spezies *Staph. intermedius* könnte eventuell Ursache von Fehldiagnosen sein, denn auch diese Spezies produziert Hämolysine und zeigt im CF-Test variable Ergebnisse (DEVRIESE und HAJEK, 1980). *Staph. intermedius* konnte jedoch nie aus Rindermilchproben isoliert werden (HAJEK, 1976; DEVRIESE und Mitarb., 1978 und 1985; JASPER und Mitarb., 1985; BIBERSTEIN und Mitarb., 1984; KLOOS und SCHLEIFER, 1981). Die ebenfalls koagulasepositive Spezies *Staph. hyicus* subsp. *hyicus* wurde aus Milchproben von Rindern mit subklinischen Mastitiden isoliert (DEVRIESE und Mitarb., 1978). *Staph. hyicus* subsp. *hyicus* vom Rind reagiert jedoch im Gegensatz zu *Staph. aureus* im CF-Test negativ, bildet kein β -Hämolysin und kein Pigment (DEVRIESE und Mitarb., 1978; DEVRIESE, 1979, DEVRIESE und HAJEK, 1980).

In den vorliegenden Untersuchungen reagierten 24,7% der koagulasepositiven Staphylokokkenstämme im CF-Test (*Staphy-*

slide) negativ (Tab. 6). Von diesen Stämmen konnten 95,4% durch die zusätzliche Berücksichtigung der Merkmale Hämolysebildung und Pigmentproduktion als *Staph. aureus* identifiziert werden.

Auf Grund dieser Ergebnisse erscheint es nötig, nach den Empfehlungen von DEVRIESE und HAJEK (1980) mindestens zwei der drei Kriterien CF, Hämolyse und Pigmentbildung zur Diagnostik von *Staph. aureus* aus Rindermilchproben heranzuziehen. Die oben genannten Autoren halten den CF-Test allein nicht für ausreichend, um *Staph. aureus* sicher zu identifizieren.

Auch in den vorliegenden Untersuchungen erwies sich der CF-Test allein als nicht ausreichend, um den Koagulase-Test in der Routinediagnostik zu ersetzen.

Zur Untersuchung des CF bewährte sich der indirekte Hämagglutinationstest. Der Staphyslide Test erzielte im Vergleich zum konventionellen Objektträgertest bessere Ergebnisse. Für die Routinediagnostik von *Staph. aureus* erscheint es empfehlenswert, nach 24 stündiger Bebrütung auf Blutagarplatten Pigmentierung und Hämolyseverhalten zu beurteilen. Mit pigmentierten und/oder β -Hämolysin bildenden Kulturen kann dann innerhalb einiger Minuten der Staphyslide Test zur Untersuchung des CF durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Eignung eines indirekten Hämagglutinationstests (Staphyslide der Fa. bio Merieux) zum Nachweis des Clumping factor von *Staphylococcus aureus*-Stämmen geprüft. Anhand von 371 Micrococcaceae-Stämmen aus Viertelgemelksproben von mastitiskranken Rindern sollte geklärt werden, ob ein solcher Test in der Routinediagnostik den Plasmakoagulasetest ersetzen kann. Mit dem Lysostaphin-Papierdisk-Test (Fa. Roche) und dem Furazolidon-Pepton-Agar konnten 330 Stämme in das Genus *Staphylococcus* eingeordnet werden. 13 Stämme wurden als Mikrokokken klassifiziert und 28 Stämme konnten nicht sicher bestimmt werden. Zur Speziesdifferenzierung der Gattung *Staphylococcus* wurden alle 330 Staphylokokkenstämme im Röhrchenkoagulaseverfahren mit Kaninchenplasma getestet. 263 Stämme waren koagulasepositiv und 67 Stämme waren koagulasenegativ. Zur Untersuchung des Clumping factor wurde die Objektträgermethode mit Kaninchenplasma (Fa. bioMerieux) und der indirekte Hämagglutinationstest durchgeführt. 198 (75,2%) koagulasepositive Stämme waren CF positiv und 65 koagulasepositive Stämme waren CF negativ. Mit dem Staphyslide Test konnten etwas bessere Resultate erzielt werden als mit dem konventionellen Objektträgertest. Alle Ergebnisse waren eindeutig. Der Staphyslidetest war einfach und schnell durchzuführen. Um

auch die koagulasepositiven, aber im Staphyslide-Test negativen Stämme identifizieren zu können, wurden die β -Hämolysin- und Pigmentproduktion als weitere Differenzierungsmerkmale herangezogen. Von den 263 koagulasepositiven Stämmen waren 53,2% CF positiv, Hämolysin positiv und Pigment bildend. 20,1% waren CF positiv, Hämolysin positiv und nicht pigmentiert. 23,6% waren CF negativ, jedoch Hämolysin und Pigment positiv.

Ein positives Ergebnis bei zwei der drei Differenzierungskriterien Staphyslide Test, Pigmentbildung und β -Hämolysinproduktion ist ausreichend für die Identifizierung von Staph. aureus. Es waren insgesamt 98% der koagulasepositiven Staphylokokken in diese Spezies einzuordnen. Zwar war der indirekte Hämagglutinationstest allein nicht ausreichend, den Röhrchenkoagulasetest in der Routinediagnostik bei der Identifizierung von Staph. aureus zu ersetzen, stellte jedoch ein ganz wichtiges Kriterium zur Differenzierung von Staph. aureus dar, wenn zusätzlich noch Pigmentbildung und Hämolysinproduktion beurteilt wurden.

Summary

Evaluation of an indirect haemagglutination test for identification of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections

The Staphyslide test (bioMerieux) an indirect haemagglutination test for detection of the clumping factor was compared with the conventional tube coagulase test to identify *Staph. aureus* from bovine mastitis.

Differentiation between the genera *Staphylococcus* and *Micrococcus* was based on susceptibility to lysostaphin using the disk method (Lysostaphintest, Roche) and on the Furazolidon-Peptone-Agar. 330 strains were identified as staphylococci and 13 strains as micrococci. 28 strains could not get characterised.

For species differentiation the tube coagulase test with rabbit plasma (bioMerieux) was performed on all 330 staphylococci. 263 isolates were coagulase positive and 67 isolates were coagulase negative.

In comparison with the conventional slide coagulase test with rabbit plasma the indirect haemagglutination test detected 198(75,2%) coagulase positive and clumping factor positive isolates and 65(24,7%) coagulase positive but clumping factor negative isolates. The Staphyslide test was more sensitive

and easier to perform than the slide coagulase test.

To characterise coagulase positive and clumping factor negative strains pigmentproduction and the β -haemolysin effect on bovine blood agar plates and D.S.T.-agarplates were considered additionally.

53,2% out of 263 coagulase positive strains were positive for the clumping factor, haemolysis and pigment. 20,1% yielded positive results for the clumping factor and haemolysis but were unpigmented. 23,6% pigmented strains were β -haemolysin positive but clumping factor negative.

For the identification of *Staph. aureus* at least two out of the three characters clumping factor, β -haemolysin and pigment should be positive. 98% of all coagulase positive staphylococci could be characterised as *Staph. aureus*.

In combination with β -haemolysin- and pigmentproduction the Staphyslide test can be recommended for the routine laboratory to identify *Staph. aureus*.

5. Literaturverzeichnis

ABO ELNAGA, I.G. und O.KANDLER (1965a)

Zur Charakterisierung der in Milch verbreiteten
Staphylokokken

Zbl.Bakt.I.Abt.Orig. 202, 351-361

ABO ELNAGA, I.G. und O.KANDLER (1965b)

Zur Verbreitung der Staphylokokken in Milch

Arch.Lebensmittelhyg. 6, 132-136

ALAMI S.Y. und F.C.KELLY (1959)

Demonstration of staphylococcal CF and free coagulase in soft
agar media

J.Bact. 78, 539-544

ALDRIDGE, K.E.; C.KOGOS; C.V.SANDERS und R.L.MARIER (1984)

Comparison of rapid identification assays for Staph. aureus

J.clin.Microbiol. 19, 703-704

AMTSBERG, G. (1978)

Untersuchungen zum Vorkommen von Staphylococcus hyicus bei
Schweinen bzw. von Staphylococcus epidermidis Biotyp 2 bei
anderen Tierarten

Dtsch.tierärztl.Wschr. 85, 385-389

AMTSBERG, G. (1979)

Vergleichende biochemische und serologische Untersuchungen an Staphylokokken von Schwein und Rind unter besonderer Berücksichtigung von *Staphylococcus hyicus* bzw. *Staph. epidermidis* Biotyp 2

Zbl.Vet.-Med.B 26, 137-152

ANON (1965)

International Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci. Minutes of first meeting

Int.Bull.bact.Nomencl. 115, 109-110

BAIRD PARKER, A.C. (1963)

A classification of Micrococci and Staphylococci based on physiological and biochemical tests

J.gen.Microbiol. 30, 409-427

BAIRD PARKER, A.C. (1965)

The classification of Staphylococci and Micrococci from world wide sources

J.gen.Microbiol. 38, 363-387

BAIRD PARKER, A.C. (1974)

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition

Buchanan R.E., N.E. Gibbons

The Williams and Wilkins Company, Baltimore

BAKER, J.S.; M.A. BORMANN und D.H. BOUDREAU (1985)

Evaluation of various rapid agglutination methods for the identification of *Staph. aureus*

J.clin.Microbiol. 21, 726-729

BALDELLON, C. und F. MEGRAUD (1985)

Characterization of micrococcaceae strains isolated from the human urogenital tract by the conventional scheme and a micromethod

J.clin.Microbiol. 21, 474-477

BARRY, A.L.; F. LACHICA und F. ATCHISON (1973)

Identification of *Staph. aureus* by simultaneous use of tube coagulase and thermonuclease tests

Appl.Microbiol. 25, 496-497

BECKER, H.; K.J. ZAADHOF und G. TERPLAN (1986)

Zur Charakterisierung von *Staphylococcus aureus*-Stämmen des Rindes unter besonderer Berücksichtigung des Klumpungsfaktors
Nach einem Vortrag anlässlich der 27. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes "Lebensmittelhygiene" der Dtsch. Vet.Med.Gesellschaft vom 9.-12. Sept. 1986 in Garmisch-Partenkirchen

BERKE, A. und R.C.TILTON (1986)

Evaluation of rapid coagulase methods for identification of
Staph. aureus

J.clin.Microbiol. 23, 916-919

BIBERSTEIN, E.L.; S.S.JANG und D.C.HIRSH (1984)

Species distribution of coagulase positive staphylococci in
animals

J.clin.Microbiol. 19, 610-615

BINDER, C. (1986)

Untersuchungen zur subklinischen Mastitis der Ziege unter
besonderer Berücksichtigung der Micrococcaceae

Vet.-med.Diss., Gießen

BIRCH-HIRSCHFELD, L. (1934)

Über die Agglutination von Staphylokokken durch Bestandteile
des Säugetierplasmas

Klin.Wschr. 13, 331-333

BLOBEL, H.; D.T.BERMAN und J.SIMON (1960)

Purification of staphylococcal coagulase

J.Bact. 79, 807-815

BLOBEL, H.; J. BRÜCKLER; D. KITZROW; K. D. HASCHE und W. SCHAEG (1976)
Einige mutmaßliche Pathogenitätsfaktoren von Staph. aureus
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 235, 91-97

BLOBEL, H. (1977)
Zur Bakteriologie der Rindermastitis
Tierärztl. Umsch. 32, 55-59

BLOBEL, H.; J. BRÜCKLER; D. KITZROW und W. SCHAEG (1977)
Zur Pathogenität von Staphylokokken
Tierärztl. Umsch. 32, 350-353

BLOBEL, H.; W. SCHAEG und J. BRÜCKLER (1981)
Demonstration and inactivation of staphylococcal clumping
factor in
Staphylococci and staphylococcal infections J. JELJASZEWICZ
(ed.)
Zbl. Bakt. Suppl. 10, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

BORNSTEIN, N. und J. FLEURETTE (1981)
Acetoin production in the identification of isolates as
members of Staphylococcus intermedius Hajek
Int. Syst. Bact. 31, 232-235

BOUWMAN, R. und H. VINCENTIE (1984)

An evaluation of the Staphyslide test for identification of
Staph. aureus

Antonie v. Leeuwenhoek 50, 195

BROWDER, H. P.; W. A. ZYMUNT und P. A. TAVORMINA (1966)

Lysis of micrococcaceae by lysostaphin

Bacteriological Proceedings A 2, 14

BROWN, R. W. und R. K. SCHERER (1978)

Classification of Staph. epidermidis and Micrococcus strains
isolated from bovine milk

Amer. J. vet. Res. 39, 767-772

BRÜCKLER, J.; W. SCHAEG und H. BLOBEL (1974)

Isolierung des Clumping factor von Staph. aureus

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 228, 465-473

BRÜCKLER, J.; U. BERLICH; W. SCHAEG und H. BLOBEL (1981a)

Clumping factor Reaktionen von Staph. aureus verschiedener
Herkunft in Plasma- und Fibrinogenpräparationen

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 251, 27-32

BRÜCKLER, J.; H. KLIMA; W. SCHÄEG; D. MANZ und H. BLOBEL (1981b)
Staph. aureus von Kühen mit subklinischen Euterinfektionen
Zbl.Vet.-Med.B 28, 494-499

BULANDA, M.; Z. WĘGRZYŃOWICZ; M. BRANDIS; J. JELASZEWICZ und
G. PULVERER (1981)

Occurrence and characterization of staphylococci strains
showing pseudocoagulase activity
Zbl.Bakt.Suppl. 10, 37-41, G. Fischer Verlag, Stuttgart

CADNESS-GRAVES, B. (1943)
Slide test for coagulase positive staphylococci
Lancet 1, 736-738

CARRET, G.; J. P. FLANDROIS; R. BISMUTH und M. SAULNIER (1982)
Relative value of staphylocoagulase and fibrinogen affinity
for the identification of Staph. aureus
J.appl.Bact. 53, 351-354

CHAPMAN, G. H.; C. BERENS; E. L. NILSON und L. G. CURCIO (1937)
The differentiation of pathogenic Staphylococci from non-
pathogenic types
J.Bact. 35, 311-333

CHAPMAN, G.H.; C. BERENS und M.H. STILES (1941)

The coagulation of plasma by staphylococci

J. Bact. 41, 431-440

COWAN, S.T. und K.J. STEEL (1964)

Comparison of differentiating criteria for staphylococci and micrococci

J. Bact. 88, 804-805

CURRY, J.C. und G.E. BOROVIAN (1976)

Selective medium for distinguishing micrococci from staphylococci in the clinical laboratory

J. clin. Microbiol. 4, 455-457

DEVRIESE, L.A.; L.V. DAMME und L. FAMEREE (1972)

Methicillin (Cloxacillin)-resistant Staph. aureus strains isolated from bovine mastitis cases

Zbl. Vet.-Med. B 19, 598-605

DEVRIESE, L.A. und J. HOMMEZ (1975)

Epidemiology of methicillin-resistant Staph. aureus in dairy herds

Res. Vet. Sci. 19, 23-27

DEVRIESE, L.A. und P.OEDING (1976)

Characteristics of *Staph. aureus* strains isolated from
different animal species

Res.Vet.Sci. 21, 284-291

DEVRIESE, L.A. (1977)

Isolation and identification of *Staph. hyicus*

Amer.J.vet.Res. 38, 787-792

DEVRIESE, L.A.; V.HAJEK; P.OEDING; S.A.MEYER und K.H.SCHLEIFER
(1978)

Staph. hyicus comb. nov. and *Staph. hyicus* subspec. *chromogenes* subspec. nov.

Int.J.Syst.Bact. 28, 482-490

DEVRIESE, L.A. (1979)

Identification of clumping factor negative staphylococci
isolated from cow's udder

Res.Vet.Sci. 27, 313-320

DEVRIESE, L.A. und J.DERYCKE (1979)

Staph. hyicus in cattle

Res.Vet.Sci. 26, 356-358

DEVRIESE, L.A. und V.HAJEK (1980)

A review: identification of pathogenic Staphylococci isolated from animals and foods derived from animals

J.appl.Bact. 49, 1-11

DEVRIESE, L.A. (1984)

A simplified system for biotyping Staph. aureus strains isolated from different animal species

J.appl.Bact. 56, 215-220

DEVRIESE, L.A.; K.H.SCHLEIFER und G.O.ADEGOKE (1985)

Identification of coagulase negative staphylococci from farm animals

J.appl.Bact. 58, 45-55

DOERN, G.V. (1982)

Evaluation of a commercial latex agglutination test for identification of Staph. aureus

J.clin.Microbiol. 15, 416-418

DUTHIE, E.S. und L.L.LORENZ (1952)

Staphylococcal coagulase: mode of action and antigenicity

J.gen.Microbiol. 6, 95-107

DUTHIE, E.S. (1954)

Evidence of two forms of staphylococcal coagulase

J.gen.Microbiol. 10, 427-436

DUTHIE, E.S. (1955)

The action of fibrinogen on certain pathogenic cocci

J.gen.Microbiol. 13, 383-393

ELEK, S.D. und E.LEVY (1950)

Distribution of haemolysins in pathogenic and non-pathogenic
staphylococci

J.Path.Bact. 62, 541-554

ELLNER, P.D. und B.MYRICK (1982)

Speciation of coagulase-negative staphylococci in the
clinical laboratory

Eur.J.clin.Microbiol. 1, 87-90

ENGELS, W.; M.A.KAMPS und C.P.VON BOVEN (1981)

Rapid and direct staphylocoagulase assay that uses a
chromogenic substrate for identification of Staph. aureus

J.clin.Microbiol. 14, 496-500

ESSERS, L. und K. RADEBOLD (1980a)

Protein A Hämagglutinationstest, eine zuverlässige Methode
zur schnellen Identifizierung von Staph. aureus

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 247, 170-176

ESSERS, L. und K. RADEBOLD (1980b)

Rapid and reliable identification of Staph. aureus by a latex
agglutination test

J. Clin. Microbiol. 12, 641-643

EVANS, J. B. (1937)

Staphylococcus Rosenbach 1884

464-466

in BREED, R. S.; G. D. MURRAY und N. R. SMITH (ed.)

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7 th edition

Williams and Wilkins Co., Baltimore

FAHLBERG, W. J. und J. MARSTON (1959)

Coagulase production by Staph. aureus

J. infect. Diseases 106, 111-122

FIELD, H. I. und H. W. SMITH (1945)

The coagulase test for Staphylococci

J. comp. Path. 55, 63-69

FINK, H.G. (1961)

Vergleichende diagnostische Untersuchungen zur routinemäßigen Differenzierung pathogener und apathogener vom Tier stammender Staphylokokken

Vet.-med.Diss., München

FINKELSTEIN, R.A. und S.E.SULKIN (1958)

Characteristics of coagulasepositive and coagulase negative staphylococci in serum soft agar

J.Bact. 75, 339-344

FISS, A. (1940)

A technique of the coagulase test for staphylococci

Brit.J.exp.Path. 21, 311-314

FLANDROIS, J.P. und G.CARRET (1981)

Study of staphylococci affinity to fibrinogen by passive hemagglutination: A tool for the Staph. aureus identification

Zbl.Bakt.I.Abt.Orig. 251, 171-176

GEDEK, W. (1966)

Zur Routinediagnostik in Milch vorkommender Staphylokokken und Mikrokokken

Arch.Lebensmittelhyg. 17, 110-113

GEDEK, W. und U. KOPP (1967)

Koagulasepositive Staphylokokken aus Kuhmilch,

1. Charakteristika

Arch. Lebensmittelhyg. 18, 247-250

GEDEK, W. (1968)

Koagulasepositive Staphylokokken aus Kuhmilch 3. Vergleiche
mit humanpathogenen Stämmen

Arch. Lebensmittelhyg. 19, 7-11

GEDEK, W. (1972)

Staphylokokken Mastitis bei Haustieren

Gustav Fischer Verlag, VEB Jena

GOLDSTEIN, J. und J. W. ROBERTS (1982)

Microtube coagulase test for detection of coagulase positive
staphylococci

J. clin. Microbiol. 15, 848-851

GOODFELLOW, M.; G. ALDERSON; M. R. NAHAIE; G. PETERS; F. SCHUMACHER-
PERDREAU; G. PULVERER; P. B. HECZKO und M. MORDARSKI (1983)

Numerical taxonomy of staphylococci

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 256, 7-24

GRAMOLI, J.L. und B.J.WILKINSON (1978)

Characterization and identification of coagulase-negative,
heat-stable deoxyribonuclease-positive staphylococci
J.gen.Microbiol. 105, 275-285

GRAZI, G.; O.SORO; P.E.VARALDO; G.CISANI und G.SATTA (1981)

Selective media for isolation and rapid identification of
Staphylococcus aureus
in: Staphylococci and Staphylococcal Infections
J.JELJASZEWICZ (ed.)
Zbl.Bakt.Suppl.10, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

GUDDING, R. und E.NESS (1985)

Identification of nuclease-positive staphylococci isolated
from animals
J.med.Microbiol. 20, 399-402

HAJEK, V. und E.MARSALEK (1971)

The differentiation of pathogenic staphylococci and a
suggestion for their taxonomic classification
Zbl.Bakt.I.Abt.Orig. 217, 176-182

HAJEK, V. (1976)

Staphylococcus intermedius: a new species isolated from
animals
Int.J.Syst.Bact. 26, 401-408

HAJEK, V. und E. MARSALEK (1976)

Evaluation of classificatory criteria for staphylococci

Zbl. Bakt. I. Abt. Suppl., 11-20

HAPKE, H. J. (1983)

Arzneimitteltherapie in der tierärztlichen Klinik und Praxis

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

HASCHE, K. D.; J. BRÜCKLER; W. SCHAEF and H. BLOBEL (1975)

Einfluß des Clumping factor von Staph. aureus auf die
Phagozytose

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 232, 446-453

HECZKO, P. B.; A. GROV und G. PULVERER (1976)

Susceptibility of staphylococci of various cell wall
structure to lysostaphin and its separated enzymes

Zbl. Bakt. I. Abt. Suppl. 5, 43-48

in: Staphylococci and Staphylococcal diseases

J. JELJASZEWICZ (ed.)

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

HECZKO, P.B.; Z.WEGRZYNOWICZ; M.BULANDA; J.JELASWICZ und
G.PULVERER (1981)

Taxonomic implications of the pseudocoagulase activity of
staphylococci

in: Staphylococci and Staphylococcal Infections

J.JELASZEWICZ (ed.)

Zbl.Bakt.Suppl.10, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

HEESCHEN, W.; J.REICHMUTH; A.TOLLE und H.ZEIDLER (1970)

Lysotypen, biochemische Leistungsspektren, Antibiogramme und
Euterpathogenität koagulasepositiver boviner Staphylokokken

Zbl.Bakt.I.Abt.Orig. 213, 333-348

HODGES, R.T.; Y.S.JONES und J.T.S.HOLLAND (1984)

Characteristics of staphylococci associated with clinical and
subclinical bovine mastitis

N.Z.vet.J. 32, 141-145

HOOVER, D.G.; S.R.TATINI und J.B.MALTAIS (1983)

Characterization of staphylococci

Appl.Environm.Microbiol. 46, 649-660

IVERSEN, O.J. und A.GROV (1973)

Studies on Lysostaphin - Separation and characterization of
three enzymes

Eur.J.Biochem. 38, 293-300

JASPER,D.E. und N.C.JAIN (1965)

Some cultural characteristics of staphylococci isolated from milk

Canad.J.comp.Med. 29, 119-124

JASPER,D.E. und N.C.JAIN (1966)

Hemolytic behavior of staphylococci isolated from cows' milk

Canad.J.comp.Med. 30, 63-70

JASPER,D.E.;F.INFANTE MARTINEZ und J.D.DELLINGER (1984)

Evaluation of latex agglutination tests for establishing coagulase status of staphylococci from milk

Canad.J.comp.Med. 48, 223-224

JASPER,D.E.;F.INFANTE und J.D.DELLINGER (1985)

Relationships among the results of coagulase, staphylococcal toxins and thermonuclease tests on staphylococci from cow milk

J.clin.Microbiol. 21, 582-584

JUNGKIND,D.L.;N.J.TORHAN;K.E.CORMAN und J.H.BONDI (1984)

Comparison of two commercially available methods with conventional coagulase test for identification of Staphylococcus aureus

J.clin.Microbiol. 19, 191-193

KITZROW,D. und H.BLOBEL (1981)

Einfluß von Staphylokinase und Proteasen von Staph. aureus
auf den Koagulasenachweis

Zbl.Vet.Med.B 28, 624-629

KITZROW,D.;W.SCHAEG und H.BLOBEL (1981)

Koagulasegewinnung von Staph. aureus Kulturen verschiedener
Herkunft

Zbl.Bakt.I.Abt.Orig. 251, 165-170

KLESIOUS,P.H. und V.T.SCHUHARDT (1968)

Use of lysostaphin in the isolation of highly polymerized
deoxyribonucleic acid and in the taxonomy of aerobic
micrococcaceae

J.Bact. 95, 739-743

KLOOS,W.E.;T.G.TORNABENE und K.H.SCHLEIFER (1974)

Isolation and characterization of Micrococci from human skin
including two new species: Micrococcus lycae and M. kristinae
Int.J.Syst.Bact. 24, 79-101

KLOOS,W.E. und K.H.SCHLEIFER (1975)

Simplified scheme for routine identification of human
Staphylococcus species

J.clin.Microbiol. 1, 82-88

KLOOS, W.E.; K.H. SCHLEIFER und W.C. NOBLE (1976)

Estimation of characteristic parameters in coagulase negative
Staphylococci species

Zbl.Bakt.I.Abt.Orig.Suppl.5, 23-41

KLOOS, W.E.; K.H. SCHLEIFER und R.F. SMITH (1976)

Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp. nov. and its
subspecies

Int.J.Syst.Bact. 26, 22-37

KLOOS, W.E. und K.H. SCHLEIFER (1981)

The genus *Staphylococcus*

in: The Prokaryotes, A handbook on habitats, isolation and
identification of bacteria

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

KROEMER, G.; H. BLOBEL und J. BRÜCKLER (1977)

Charakterisierung von Staphylokokken in Mikrotitrierplatten

Zbl.Bakt.I.Abt.Orig. 237, 183-188

KROHNER, K. (1967)

Differenzierung von aus Kuhmilch isolierten koagulasepositi-
ven Staphylokokken

Vet.-med. Diss., München

LACHICA, R.V.F.; P.D.HOEPRICH und C.GENIGEORGIS (1971)

Nuclease production and lysostaphin susceptibility of *Staph. aureus* and other catalase positive cocci

Appl.Microbiol. 21, 823-826

LOEB, L. (1903)

The influence of certain bacteria on the coagulation of blood

J.med.Res. 10, 407

LOMINSKI, J. (1953)

A coagulase destroying factor produced by variants of *Staph. aureus*

Nature 171, 214

MARSALEK, E. und V.HAJEK (1973)

The classification of pathogenic staphylococci

Contributions to microbiology and immunology Vol.1

in: Staphylococci and staphylococcal infections 30-37

J.JELJASZEWICZ (ed.); S.Karger Verlag, Basel

MESSER, J. (1961)

Beitrag zur Differenzierung in Milch vorkommender Staphylokokken

Vet.-med.Diss, Gießen

MÖLLBY, R. und T. WADSTRÖM (1973)

Purification of staphylococcal beta, gamma and delta hemolysins

Contributions to microbiology and immunology, Vol. 1

in: Staphylococci and staphylococcal infections, 298-312

J. JELJASZEWICZ (ed.); Karger Verlag, Basel

MORTON, H. E. und J. COHN (1972)

Coagulase and desoxyribonuclease activities of staphylococci isolated from clinical sources

Appl. Microbiol. 23, 725-733

MOSSEL, D. A. A. (1962)

Attempt in classification of catalase positive staphylococci and micrococci

J. Bacteriol. 84, 1140-1147

MUCH, H. (1908)

Über eine Vorstufe des Fibrinfermentes in Kulturen von Staph. aureus

Z. Biochem. 14, 143-155

MUNCH-PETERSEN, E. (1960)

Staphylococcal coagulase

Spez. med. Mikrobiol. 377-401

MUNCH-PETERSEN, E. und M. R. GARDINER (1965)

Staphylococci in secretions from bovine udder in Western Australia

Aust.vet.J. 41, 5-13

MYRICK, B. A. und P. D. ELLNER (1982)

Evaluation of the latex slide agglutination test for identification of Staph. aureus

J.clin.Microbiol. 15, 275-277

NAIDU, T. G. und F. H. S. NEWBOULD (1973)

Significance of beta hemolytic Staph. aureus as a pathogen of the bovine mammary gland

Zbl.Vet.Med.B 22, 308-317

ORTH, D. S.; L. R. MUGG und A. W. ANDERSON (1971)

Comparison of animal sera for suitability in coagulase testing

Appl.Microbiol. 21, 420-425

OBIGER, G. (1960)

Zur Frage der milchhygienischen Bedeutung der Staphylokokken

Arch.Lebensmittelhyg. 12, 265-270

PENNELL, D.R.; J.A. ROTT-PETRI und T.A. KURZYNSKI (1984)

Evaluation of three commercial agglutination tests for the identification of *Staph. aureus*

J.clin.Microbiol. 20, 614-617

PHILIPPS, W.E. und W.E. KLOOS (1981)

Identification of coagulasepositive *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* isolates from veterinary clinical specimens

J.clin.Microbiol. 14, 671-673

POUTREL, B. und J.P. CAFFIN (1981)

Lysostaphin disk test for routine presumptive identification of staphylococci

J.clin.Microbiol. 13, 1023-1025

PULVERER, G. (1968a)

Untersuchungen mit Lysostaphin: 1. Lysostaphin - Empfindlichkeit von 355 *Staph. aureus*-Stämmen menschlicher Herkunft

Z.med.Mikrobiol.Immunol. 154, 40-48

PULVERER, G. (1968b)

Untersuchungen mit Lysostaphin: 2. Lysostaphin - Empfindlichkeit von 230 *Staph. aureus*-Stämmen tierischer Herkunft

Z.med.Mikrobiol.Immunol. 154, 49-53

PULVERER, G. (1980)

Prothrombin activation by a metalloprotease from
Staphylococcus aureus

J.clin.Microbiol. 12, 138-139

RAUS, J. und D.N.LOVE (1983)

Characterization of coagulase positive *Staph. intermedius* and
Staph. aureus isolated from veterinary clinical specimens

J.clin.Microbiol. 18, 789-792

RAYMAN, M.K.; C.E.PARK; J.PHILPOTT und E.TODD (1975)

Reassessment of the coagulase and thermostable nuclease tests
as means of identifying *Staph. aureus*

Appl.Microbiol. 29, 451-454

RAYMOND, E.A. und W.H.TRAUB (1970)

Identification of staphylococci isolated from clinical
material

Appl.Microbiol. 19, 919-922

REID, W.B. und J.B.WILSON (1959)

A study of the staphylococci associated with the bovine udder
Amer.J.vet.Res. 20, 825-831

ROLLE, M. und A. MAYR (1984)

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre

Herausgegeben von Anton Mayr, 5. Auflage

Enke Verlag, Stuttgart

ROTTER, J. und F. C. KELLY (1966)

Serological reactions associated with the Clumping factor of
Staph. aureus

J. Bact. 91, 588-594

SCHALM, D. W. und G. M. WOODS (1959)

Micrococcus pyogenes in bovine milk 1. Identification

Amer. J. vet. Res. 14, 530-533

SCHINDLER, C. A. und V. T. SCHUHHARDT (1964)

Lysostaphin: A new bacteriolytic agent for the Staphylococcus

Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 51, 414-421

SCHINDLER, C. A. (1966)

Staphylococcal strains with relation to lysostaphin
sensitivity

Nature 209, 1368-1369

SCHLEIFER, K.H. und M.KOCUR (1973)

Classification of staphylococci based on chemical and
biochemical properties

Arch.Mikrobiol. 93, 65-85

SCHLEIFER, K.H. und W.E.KLOOS (1975)

Isolation and characterisation of staphylococci from human
skin

Int.J.Syst.Bact. 25, 50-61 und 62-79

SCHLEIFER, K.H. und W.E.KLOOS (1976)

Separation of staphylococci from micrococci

Zbl.Bakt.I.Abt.Suppl.5, 3-9

SCHLEIFER, K.H.; F.SCHUMACHER-PERDREAU; F.GÖTZ und B.POPP (1976)

Chemical and biochemical studies for the differentiation of
coagulase positive staphylococci

Arch.Mikrobiol. 110, 263-270

SCHLEIFER, K.H. (1981)

Die Klassifikation von Staphylococcus und Micrococcus

Ein Beispiel für die moderne Bakteriensystematik

Forum Mikrobiologie 5, 272-278

SCHLEIFER, N.H.; R.KILPPER-BÄLZ; U.FISCHER; A.FALLER und J.ENDL
(1982)

Identification of *Micrococcus candidus* as a strain of *Staph.*
epidermidis and of *Micrococcus caseolyticus* and *Micrococcus*
varians as members of a new species, *Staph. caseolyticus*
Int.J.Syst.Bact. 32, 15-20

SEIFFGE, D. (1976)

Untersuchungen über die Koagulase von *Staph. aureus*
Vet.-med.Diss., Gießen

SHANHOLTZER, C.J. und L.R.PETERSON (1982)

Clinical laboratory evaluation of the thermonuclease test
Amer.J.clin.Path. 77, 587-591

SPERBER, W.H. und S.R.TATINI (1975)

Interpretation of the tube coagulase for identification of
Staph. aureus
Appl.Microbiol. 29, 502-505

SUBCOMMITTEE ON TAXONOMY OF STAPHYLOCOCCI AND MICROCOCCI
(1985)

Int.Bull.bact.Nomencl. 15, 109-110

SWITALSKI, L.M. (1976)

Isolation and purification of staphylococcal clumping factor
Zbl.Bakt.I.Abt.Suppl. 5, 413-425

TERPLAN, G. und W.GEDEK (1965)

Zur Differenzierung von aus Rindereutern isolierten Micro-
cocccaceae
Arch.Lebensmittelhyg. 16, 203-207

TERPLAN, G. und K.J.ZAADHOF (1969)

Zur diagnostischen und lebensmittelhygienischen Bedeutung von
Staphylococcus aureus in Kuhmilch
Dtsch.tierärztl.Wschr. 9, 217-221

URBANCZIK, R. (1984)

Koagulase negative Staphylokokken in Urinproben: Die Häufig-
keit ihres Vorkommens und die Empfindlichkeit gegen
Chemotherapeutika
Ärztl.Labor 30, 65-68

VON RHEINBABEN, K.E. und R.M.HADLOK (1981)

Rapid distinction between micrococci and staphylococci with
furazolidone agars
Antonie v.Leeuwenhoek 47, 41-51

WEGRZYNOWICZ, Z.; P.B. HECZKO; J. JELJASZEWICZ; M. NEUGEBAUER und G. PULVERER (1979)

Pseudocoagulase activity of staphylococci

J.clin.Microbiol. 9, 15-19

WEGRZYNOWICZ, Z.; P.B. HECZKO; G. DRAPEAU; J. JELJASZEWICZ und G. PULVERER (1980)

Prothrombin activation by a metalloprotease from Staph. aureus

J.clin.Microbiol. 12, 138-139

YRIOS, J.W. (1977)

Comparison of rabbit and pig plasma in the tube coagulase test

J.clin.Microbiol. 5, 221-224

ZAJDEL, M.; Z. WEGRZYNOWICZ; J. JELJASZEWICZ und G. PULVERER (1973)

Mechanism of action of staphylocoagulase and clumping factor

Contributions to Microbiology and Immunology Vol.1

Staphylococci and staphylococcal infections J. JELJASZEWICZ

(editor) Karger Verlag, Basel

ZAJDEL, M.; Z. WEGRZYNOWICZ; J. SAWECHA; J. JELJASZEWICZ und G. PULVERER (1976)

Mechanism of action of staphylocoagulase

Zbl.Bakt.I.Abt.Suppl. 5, 594-575

ZARZOUR, Y.Y. und E.A.BELLE (1978)

Evaluation of three test procedures for identification of
Staph. aureus from clinical sources

J.Clin.Microbiol. 7, 133-136

ZYGMUNT, W.A.; H.P.BROWDER und P.A.TAVORMINA (1968)

Susceptibility of coagulase negative staphylococci to
lysostaphin and other antibiotics

Appl.Microbiol. 16, 1168-1173 und 1174-1178

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. K. Walser für die Überlassung des Themas sowie für die fachliche Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. W. Gedek und seinen Mitarbeitern vom Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. in Grub, von denen mir die untersuchten Kulturen zur Verfügung gestellt wurden.

Lebenslauf

Geburtsdatum: 17. August 1958
Geburtsort: München
Eltern: Dr. Elfriede Schweighart, geb. Pachtner
Richard Schweighart

1965 - 1969: Grundschule in München
1969 - 1971: Elsa Brandström-Gymnasium in München
1971 - 1979: Bertolt Brecht-Gymnasium in München
Mai 1979: Abitur
1979 - 1981: Studium an der Simon Fraser University in
Vancouver, Kanada
1981 - 1986: Studium der Tiermedizin an der Ludwig-
Maximilians-Universität in München
August 1986: Staatsexamen
Sept. 1986: Approbation
Seit Okt. 1986: Dissertation

